



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea Specialistica in
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

Tesi di Laurea

**Attività antitumorale dell'endocannabinoide
anandamide su cellule di melanoma cutaneo A375**

Relatori

Prof.ssa Paola Nieri

Dott.ssa Barbara Adinolfi

Candidato

Carlotta Soldani

Anno Accademico 2012/2013

Indice

Capitolo 1 Introduzione	5
1.1 <i>ECS : il sistema endocannabinoide</i>	5
1.1.1 <i>I recettori cannabinoidi</i>	5
1.1.2 <i>I composti endocannabinoidi</i>	6
1.1.3 <i>Biosintesi e degradazione di AEA e 2-AG</i>	8
1.1.4 <i>Sistema endocannabinoide (ECS) e Patologie</i>	11
1.1.5 <i>Sistema endocannabinoide e Cancro</i>	12
1.1.6 <i>Effetti anticancro mediati dai recettori CB</i>	13
1.2 <i>TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1)</i>	15
1.3 <i>PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors)</i>	16
1.3.1 <i>PPAR e cannabinoidi</i>	17
1.3.2 <i>Interazione PPAR/cannabinoidi</i>	18
1.4 <i>GPR55 (G Protein-coupled Receptor 55)</i>	20
1.4.1 <i>Ligandi per il GPR55</i>	21
1.4.2 <i>GPR55 e cancro</i>	24
1.4.3 <i>Meccanismi di trasduzione del segnale</i>	25
 Capitolo 2 Scopo della Tesi	 27
 Capitolo 3 Materiali e metodi	 29
3.1 <i>Materiali utilizzati negli studi funzionali</i>	29
3.1.1 <i>Farmaci e composti commerciali utilizzati</i>	29
3.1.2 <i>Linee cellulari</i>	31
3.2 <i>Materiali per gli studi di biologia molecolare</i>	32
3.2.1 <i>Oligo utilizzati</i>	32

3.2.2 Kit e reagenti	34
3.3 Metodi utilizzati per studi funzionali	35
3.3.1 Scongelo della linea cellulare	35
3.3.2 Mantenimento in coltura	36
3.3.3 Congelamento cellulare	37
3.3.4 Analisi della vitalità cellulare	38
3.4 Metodi studi di biologia molecolare.....	41
3.4.1 Estrazione dell'RNA totale.....	41
3.4.2 Retrotrascrizione	44
3.4.3 RT-PCR.....	45
3.4.4 Elettroforesi su gel di agarosio.....	47
Capitolo 4 Risultati	49
4.1 Valutazione dell'attività citotossica dell'AEA	49
4.1.1 Coinvolgimento del recettore CB1 nell'azione citotossica di AEA	50
4.1.2 Il contributo del metabolismo COX-2 all'azione citotossica di AEA	51
4.1.3 Coinvolgimento del recettore GRP55 nell'azione citotossica di AEA	52
4.1.4 Coinvolgimento del recettore TRPV1 nell'azione citotossica di AEA	54
4.2 Profili di espressione ottenuti con RT-PCR su cellule di cheratinociti umani HaCaT	56
Capitolo 5 Conclusioni.....	58

Abbreviazioni utilizzate nel testo	60
---	-----------

Bibliografia.....	62
--------------------------	-----------

Indice figure	65
----------------------------	-----------

Capitolo 1

Introduzione

1.1 ECS: il sistema endocannabinoide

Il sistema endocannabinoide (ECS) è composto dai recettori cannabinoidi (CB₁ e CB₂), dai composti endocannabinoidi, sostanze in grado di legare i recettori cannabinoidi, e dall'insieme delle proteine responsabili della biosintesi, ricaptazione e metabolismo degli endocannabinoidi [Pertwee R.G. 2010].

1.1.1 I recettori cannabinoidi

Attualmente sono stati identificati due sottotipi di recettori cannabinoidi: il recettore cannabinoide di tipo 1 (CB₁) e il recettore cannabinoide di tipo 2 (CB₂); entrambi fanno parte della famiglia dei recettori accoppiati a proteine G. (fig.1)

Il recettore CB₁ fu clonato per la prima volta nel 1990 da una libreria di cDNA prelevata dalla zona corticale del ratto, successivamente fu clonato l'analogo umano. Il gene codifica per una proteina di 472 amminoacidi, altamente conservata, con una omologia di sequenza amminoacidica del 98-99% fra le varie specie [Howlett A.C. *et al.*, 2002]. Il recettore è altamente espresso nel cervello, in particolare nei gangli della base, a livello dell'amigdala e della substantia nigra (pars reticolata), nell'ippocampo, nel globo pallido (interno ed esterno) e nel cervelletto [Van Sickle M.D. *et al.*, 2005]. Il recettore CB₁ a livello centrale risulta implicato nel controllo dell'attività analgesica, modulazione della temperatura corporea e locomozione [Hermanson D.J. *et al.*, 2011]. E'

espresso anche perifericamente in distretti quali milza, occhio, testicoli e utero. La sua attivazione porta alla trasduzione del segnale mediata dalle proteine $G_{i/o}$, con conseguente inibizione dell'adenilato ciclasi, attivazione della via delle proteine chinasi attivate da mitogeno (MAPK), attivazione della via fosfoinositolo-3-chinasi (PI3K) e modulazione dei canali ionici [Alexander A. *et al.*, 2009].

Il recettore CB_2 fu clonato per la prima volta nel 1993 da cellule HL-60. Il gene codifica per una proteina di 360 aminoacidi con solo una omologia del 48% con il recettore CB_1 [Howlett A.C. *et al.*, 2002]. Il recettore è altamente espresso nelle cellule del sistema immunitario e la sua attivazione porta alla trasduzione del segnale mediata dalla proteina G_i e all'attivazione delle vie intracellulari sopra descritte.

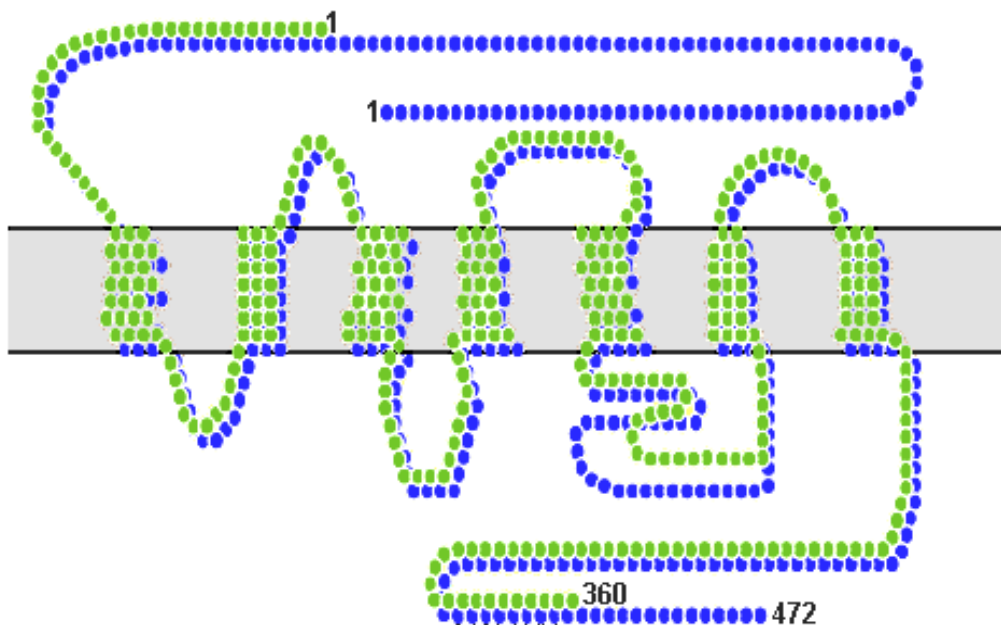


Figura 1. Strutture dei recettori cannabinoidi umani CB_1 e CB_2 .

1.1.2 I composti endocannabinoidi

Successivamente alla scoperta dei recettori cannabinoidi avvenne anche l'identificazione di una famiglia di trasmettitori lipidici in grado di legare

naturalmente i recettori CB_1 e CB_2 , della quale i principali componenti sono: l'arachidoniletanolammide (AEA), chiamata comunemente anandamide (dal Sanscrito "beatitudine interna"), e il 2-arachidonilglicerolo (2-AG) (fig.2). Tali endocannabinoidi sono derivati dell'acido arachidonico coniugato con etanolamina o glicerolo [De Fomesca F.R. *et al.*, 2005].

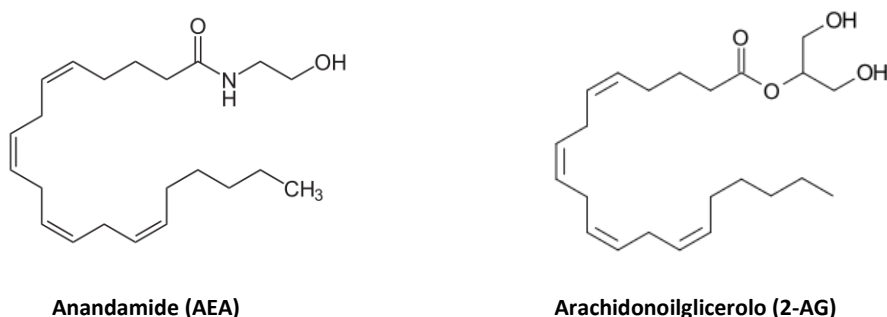
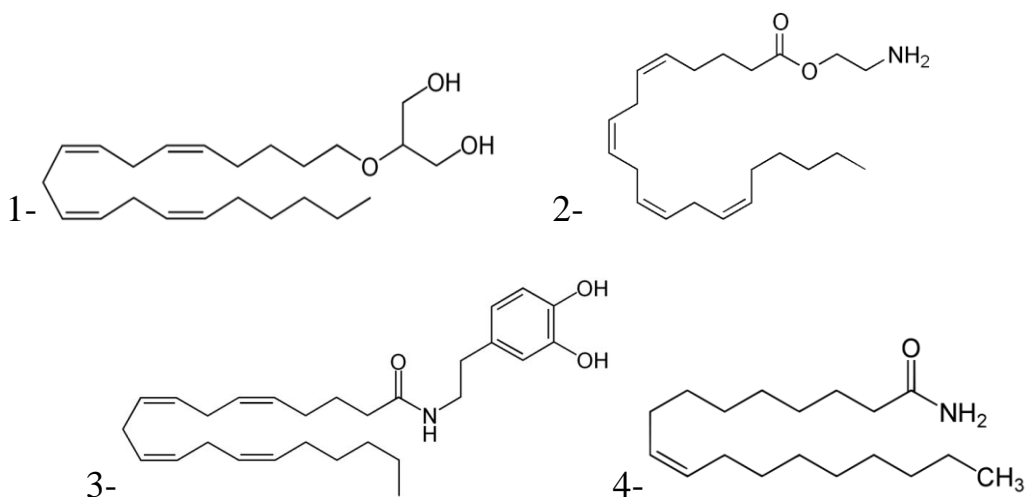


Figura 2. Strutture degli endocannabinoidi AEA e 2-AG.

Nel tempo, sono state identificate altre molecole lipidiche ligandi dei recettori CB quali N-palmitoiletanolamina (PEA), Noladina, Oleamide, N-arachinodildopamina (NADA) e Virodamina [Grimaldi C. e Capasso A. 2011] (fig.3).



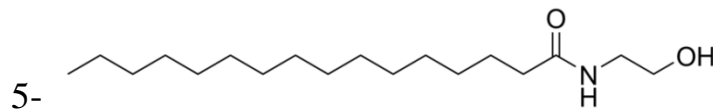


Figura 3. Strutture degli endocannabinoidi: 1-NOLADIN ETERE, 2-VIRODAMINA, 3- N-ARACHINODIL DOPAMINA, 4- OLEAMIDE, 5- N-PALMITOILETANOL AMINA

Recentemente è stato dimostrato *in vitro* che anche la *docosahexaenoyl ethanolamide* (DHEA) e la *eicosapentaenoyl ethanolamide* (EPEA) attivano i recettori CB₁ e CB₂ [Brown I. *et.al.*, 2010]. Questi endocannabinoidi sono ancora in fase di studio e, ad oggi, gli endocannabinoidi più studiati restano l'AEA e il 2-AG.

1.1.3 Biosintesi e degradazione di AEA e 2-AG

La biosintesi e degradazione degli endocannabinoidi avviene su richiesta. Gli endocannabinoidi sono rilasciati dalle cellule immediatamente dopo la biosintesi e svolgono la loro azione localmente, in quanto vengono inattivati rapidamente in condizioni fisiologiche a causa della loro elevata lipofilicità [Di Marzo V. 2009].

La principale via biosintetica per l'anandamide prevede il trasferimento dell'acido arachidonico (AA) dalla posizione sn-1 della fosfatidilcolina (PC) all'azoto della fosfatidiletanolamina (PE) a formare N-arachinodiletanolamina (NAPE); il processo è catalizzato dall'enzima N-aciltransferasi (NAT). NAPE è trasformato successivamente in AEA in un solo passaggio di idrolisi catalizzato dall'enzima fosfolipasi D NAPE-specifico (NAPE-PLD) (fig.4).

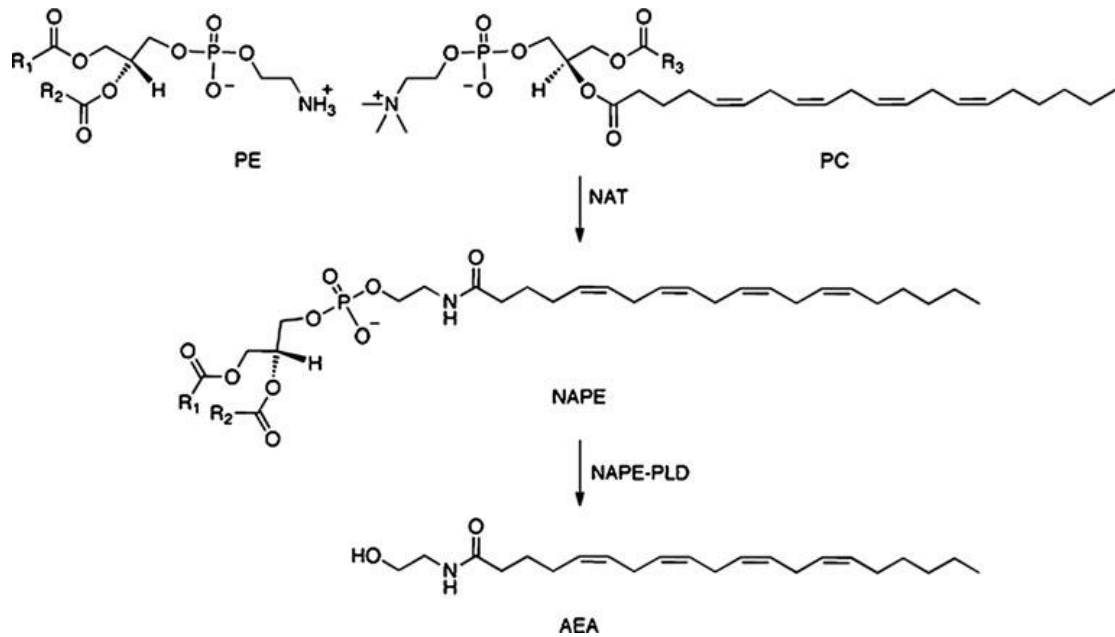


Figura 4. Biosintesi AEA

La sintesi del 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) prevede l'idrolisi del fosfatidilinositolo-4,5 bifosfato (PIP₂), catalizzata dall'enzima fosfolipasi c-β (PLC-β) a formare diacilglicerolo (DAG). Successivamente il DAG viene idrolizzato a 2-AG dalla diacilglicerolo lipasi (DAGL) (fig.5) [Hermanson J.D. *et al.*, 2011].

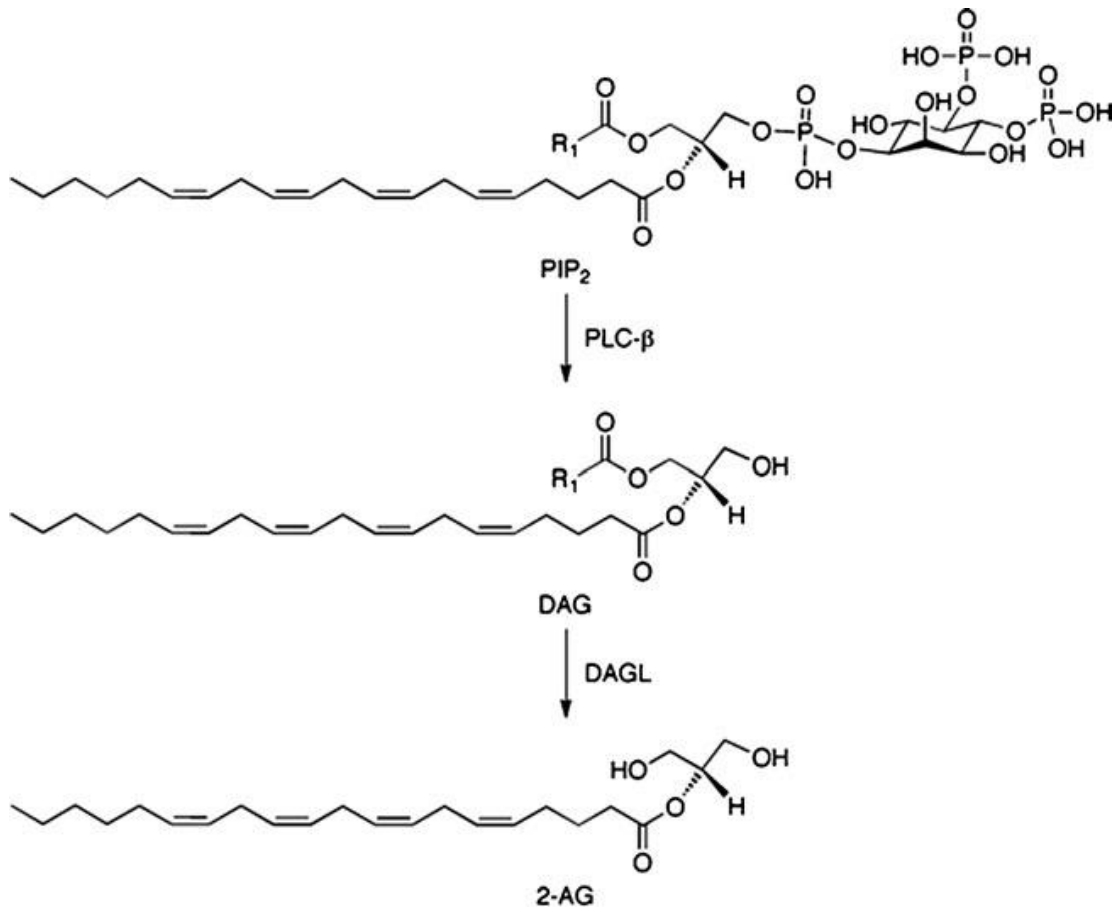


Figura 5. Biosintesi del 2-AG

Una volta sintetizzati, gli endocannabinoidi vengono rapidamente idrolizzati e degradati (fig.6). L'enzima principale che catalizza la degradazione dell'AEA è il "Fatty Acid Amide Hydrolase" (FAAH) che la trasforma in acido arachidonico e etanolamina. Il 2-AG è degradato principalmente dall'enzima Monoacilglicerolo lipasi (MAGL) in acido arachidonico e glicerolo; tuttavia, in particolari condizioni, il 2-AG è degradato anche dal FAAH. Interessante è l'azione che questi prodotti del metabolismo hanno su alcuni processi biologici. Infatti è stato visto che le etanolamidi, prodotti del metabolismo FAAH, proteggono le cellule di neuroblastoma dall'apoptosi [Flygare J. e Sander B. 2008].

Oltre ad essere substrato di enzimi specifici che rientrano nel sistema endocannabinoidale, gli endocannabinoidi sono il substrato di altri enzimi,

quali la ciclossigenasi-2 (COX-2), le lipossigenasi (LOXs), il citocromo P450 e il “palmitoyethanolamide-preferring acid amidase” (PAA) che possono generare altri composti coinvolti in processi biologici e patologici [Flygare J. e Sander B. 2008; Hamerson J.D. *et al.*, 2011]. E’ stato osservato, per esempio, che, nella linea di cheratinociti umani JWF2, le prostaglandine etanolamidi (PG-EA), prodotti del metabolismo COX-2, erano citotossiche [Van Dross Rukiyah T. 2009].

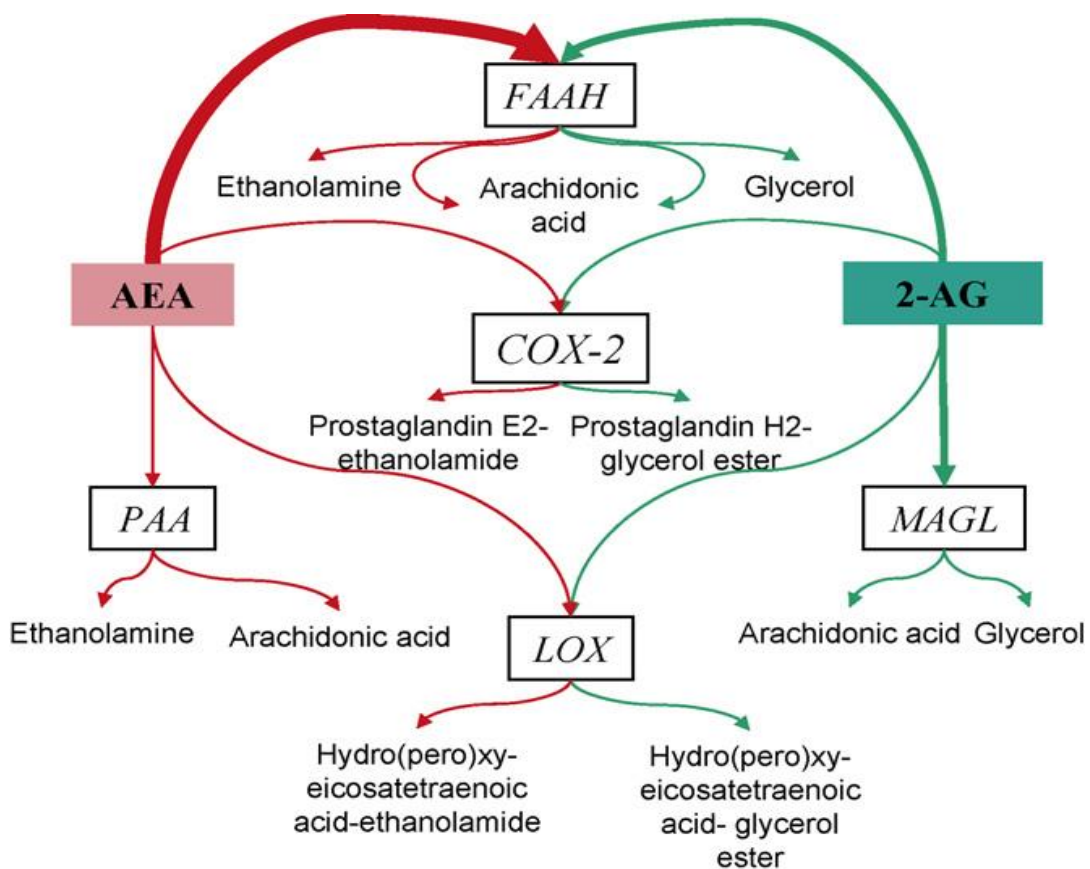


Figura 6. Metabolismo di AEA e 2-AG

1.1.4 Sistema endocannabinoide (ECS) e Patologie

Il sistema endocannabinoide gioca un ruolo importante nella regolazione di proteine e fattori nucleari necessari alla proliferazione e al differenziamento cellulare. La modulazione del sistema

endocannabinoide può essere importante nella cura di molte malattie e condizioni patologiche quali:

- Ansia
- Disordini del movimento (Parkinson e Huntington)
- Malattie neuropatiche
- Sclerosi multipla
- Lesioni del midollo spinale
- Arteriosclerosi
- Infarto del miocardio
- Ipertensione
- Glaucoma
- Sindromi metaboliche/obesità-anoressia
- Osteoporosi
- Cancro

1.1.5 Sistema endocannabinoide e Cancro

Le proprietà antiproliferative dei composti cannabinoidi furono identificate per la prima volta più di 35 anni fa, in seguito all'osservazione, sia attraverso studi *in vivo* che *in vitro*, che il Δ^9 -THC determinava una inibizione della crescita cellulare nell'adenocarcinoma polmonare nel topo [Munson A.E. *et al.*, 1975]. Negli ultimi 14 anni l'intensificarsi di studi su modelli *in vitro* di diversi tipi di cancro (glioma, glioblastoma multiforme, tumore alla prostata, tumori della tiroide, tumori del seno, carcinoma del colon, leucemia, tumori dei linfonodi ecc.) ha permesso di identificare alcuni meccanismi attraverso cui i composti cannabinoidi (naturali e sintetici) e gli endocannabinoidi,

agiscono su proliferazione, migrazione e apoptosi delle cellule tumorali[Pisanti S. *et al.* 2009; Grimaldi C. and Capasso A., 2011].

1.1.6 Effetti anticancro mediati dai recettori CB

Come sopra accennato, numerose evidenze della letteratura indicano un effetto antitumorale di molecole cannabinoidi sia naturali che sintetiche. Tra i meccanismi responsabili, è stato osservato che differenti molecole cannabinoidi sono in grado di indurre il rilascio *ex-novo* di ceramidi, famiglia di molecole lipidiche formate da sfingosina e un acido grasso che si trovano nella membrana cellulare. L'aumento di ceramide endogena induce l'attivazione della cascata delle ERK, via proteina chinasi inibitoria ciclina dipendente (p27/KIP1), con conseguente arresto del ciclo cellulare e morte per apoptosi.

L'arresto del ciclo cellulare induce, infatti, *l'up-regulation* della proteina p53 la quale modula l'incremento di BAX (proteina pro-apoptotica) e la diminuzione di Bcl2 (proteina antiapoptotica) con conseguente attivazione delle caspasi e promozione dell' apoptosi.

Un'altra via promossa dalla ceramide è quella della proteina chinasi attivata dal mitogeno p38 (p38MAPK) che porta anch'essa ad apoptosi tramite attivazione caspasica o rilascio di citocromo C dai mitocondri.

Un altro meccanismo con cui può avvenire il processo apoptotico in seguito all'attivazione dei CB₁ e CB₂ è l'inibizione dell'adenilato ciclasi (AC) con abbassamento dei livelli di AMP ciclico (cAMP) e riduzione dell'attività della proteina chinasi A (PKA) che determina una inibizione della trascrizione genica e apoptosi.

La sola attivazione di CB₁ ha mostrato di avere anche effetti pro-apoptotici grazie all'inibizione della proteina Ras (p21Ras), coinvolta nella induzione della sintesi di DNA [Guindon J. and Hohmann A.G. 2011].

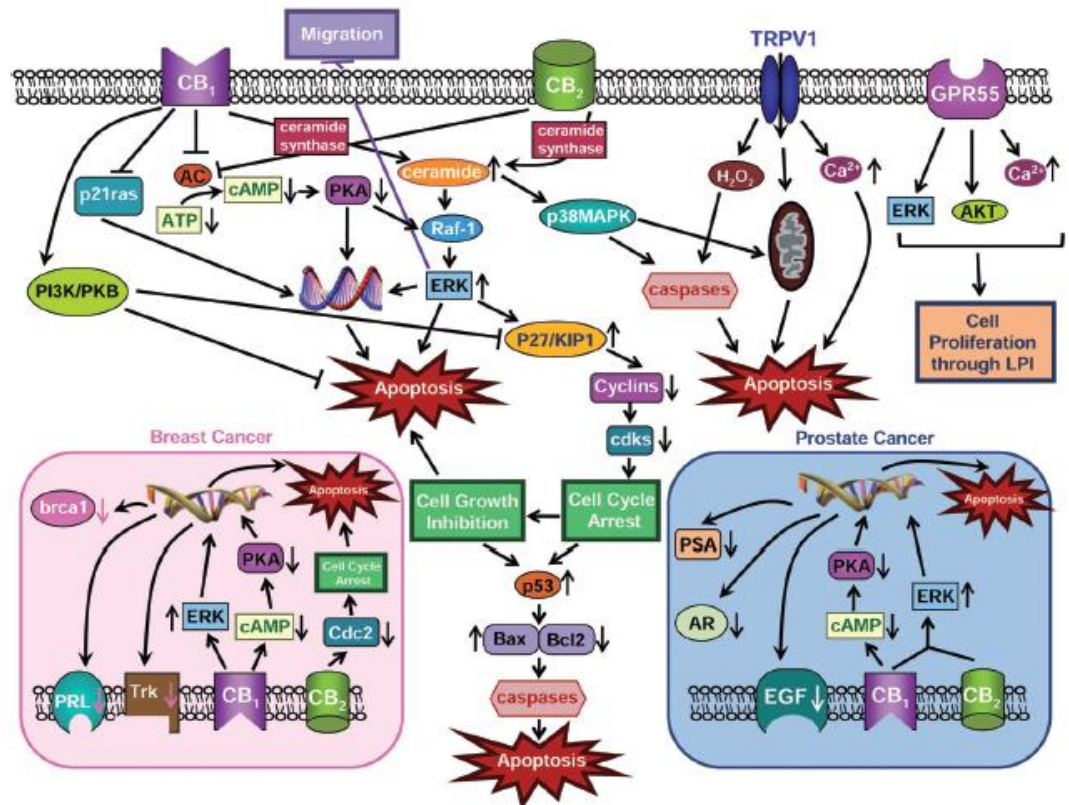


Figura 7. Attivazione dei recettori cannabinoidi.

Se da una parte i dati raccolti in questi studi hanno permesso di delineare un quadro dei possibili meccanismi di morte cellulare associati all'attivazione del sistema endocannabinoide in cellule tumorali, dall'altra hanno reso possibile l'osservazione che non tutti gli effetti sono mediati dall'interazione con i recettori cannabinoidi. Molecole descritte come ligandi CB₁/CB₂ specifici hanno, infatti, dimostrato di essere in grado di legare altri target, quali:

- il recettore-canale TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid 1*);
- i recettori nucleari PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*), in particolare il PPAR α e il PPAR γ ;
- il recettore GPR55 (*G Protein-coupled Receptor*) [Pertwee R.G., 2010].

1.2 TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1)

Il recettore vanilloide TRPV1 è un recettore-canale calcio selettivo (*transient receptor potential cation channel*) formato da sei domini trans-membrana (TM) e da un poro idrofobico fra il quinto e il sesto dominio TM (fig.8); questa struttura è simile a molti canali ionici quali ad esempio i canali HCN (*Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channels*) e i canali CNG (*cyclic nucleotide-gated K⁺ channels*). Il recettore appartiene alla famiglia dei recettori TRPV che a loro volta fanno parte della superfamiglia dei recettori ionici TRP (*Transient Receptor Potential*) [Tominaga M. e Tominaga T. *et al.*, 2005].

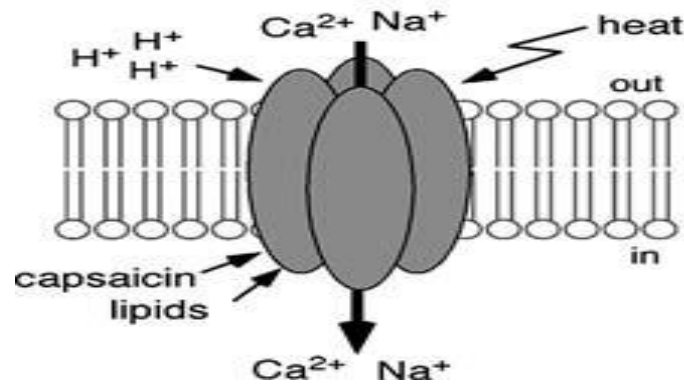


Figura 8. Struttura recettore TRPV1

Esso si trova largamente espresso a livello periferico nel sistema nervoso, ma anche in altri distretti come le cellule epiteliali bronchiali, della vescica e i cheratinociti della pelle. Il recettore è selettivamente attivato dalla capsaicina, principale ingrediente del peperoncino, ma anche dal calore ($T > 43^{\circ}C$), da composti acidi e da varie molecole lipidiche [Kato Shinichi *et al.*, 2003]. Inoltre, risultano essere attivatori endogeni del TRPV1 i composti endocannabinoidi, quali l'anandamide che, in alcune cellule tumorali, promuoverebbe un effetto apoptotico grazie all'interazione con questo specifico recettore. L'attivazione del recettore può determinare aumento dei livelli intracellulari di H_2O_2 , e di calcio e liberazione di citocromo C dai mitocondri, causando apoptosi tramite uno o tutti e tre i meccanismi sopra indicati [Guindon J. e Hohmann A.G. 2011].

1.3 PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors)

I PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) sono recettori nucleari che includono 3 isoforme : α , β e γ . Queste tre isoforme formano

eterodimeri con i recettori X per i retinoidi e, legandosi a determinate sequenze del DNA, possono regolare la trascrizione di numerosi geni implicati nel metabolismo, omeostasi, differenziamento cellulare e processi infiammatori.

L'isoforma α è stata trovata in tessuti metabolicamente attivi come fegato, cuore e muscolo ed è implicata nel catabolismo degli acidi grassi e nei processi infiammatori.

L'isoforma γ ha tre varianti: $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$.

- $\gamma 1$ è ubiquitariamente espressa
- $\gamma 2$ è espressa nel tessuto adiposo
- $\gamma 3$ è espressa nei macrofagi

Il PPAR γ è coinvolto nella formazione degli adipociti, nella captazione dell'insulina e nell'infiammazione [O'Sullivan SE 2007].

La funzione dell'isoforma β è stata per molti anni sconosciuta, solo nel 2006 è stato osservato che è implicato nella regolazione del metabolismo [Barish G.D. *et al.*, 2006]. Inoltre tutte e tre le isoforme sono espresse nel cervello e nel sistema nervoso periferico.

1.3.1 PPAR e cannabinoidi

Il sito di legame nei recettori PPAR è molto grande e di conseguenza non molto selettivo. I recettori vengono, di conseguenza, attivati da una serie di ligandi naturali e sintetici diversi dal punto di vista strutturale e chimico. Gli acidi grassi insaturi, l'acido linolenico, l'acido petroselinico e l'acido arachidonico sono dei buoni attivatori dei recettori PPAR con un EC₅₀ nel range 2-20 μ M [Kliwer S.A. *et al.* 1997].

Nel 2002 è stata descritta per la prima volta l'interazione fra molecole cannabinoidi e recettori PPAR grazie ad un metabolita del 2-AG, il "15-hydroxyeicosatetraenoic acid glyceryl ester" (15-HETE-G), prodotto del metabolismo LOX. Questo metabolita aumentava l'attività trascrizionale del PPAR α . Nel 2003 è stato visto che anche la oleiletanolamide (OEA) legava e aumentava l'attività trascrizionale del PPAR α . L'OEA è un derivato dell'etanoloamide e dell'acido oleico, con una via biosintetica simile all'AEA, ma non lega i recettori CB. Anche la palmitoiletanolamide (PEA) attiva il recettore PPAR α ma non i recettori CB. Altri endocannabinoidi attivano il PPAR α , tra i quali l'AEA e la virodamina, con concentrazioni simili a quelle riportate per gli acidi grassi sopra elencati. Nel 2003 è stato visto che l'acido ajulemico, cannabinoide sintetico, attiva il recettore PPAR γ [O'Sullivan SE 2007].

1.3.2 Interazione PPAR/cannabinoidi

Non è ancora completamente chiaro come i composti cannabinoidi interagiscano con i recettori PPAR; sono stati proposti tre possibili meccanismi di interazione [O'Sullivan SE 2007]:

- I. Un legame diretto dei cannabinoidi e endocannabinoidi a questi recettori, con conseguente modificazione nell'espressione di specifici target genici.
- II. Un legame dei metaboliti dei composti cannabinoidi e endocannabinoidi con i recettori PPAR e loro attivazione [Rockwell C.E. e Kaminski N.E. 2004].
- III. Una attivazione da parte di cannabinoidi e endocannabinoidi dei recettori sulla superficie cellulare, che a sua volta

promuovono una cascata intracellulare che porta all'attivazione dei PPAR.

Potenzialmente tutte e tre i meccanismi possono contribuire all'azione dei cannabinoidi sui PPAR; il contributo di ciascuna via dipenderà dalla espressione dei recettori e degli enzimi nelle specifiche cellule [O'Sullivan SE 2007].

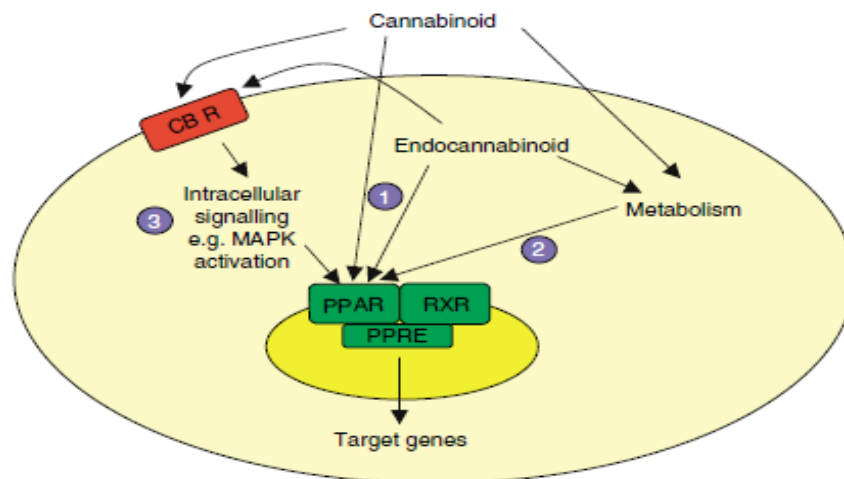


Figura 9. Possibili meccanismi di attivazione dei recettori PPAR da parte dei cannabinoidi e degli endocannabinoidi

1.4 GPR55 (*G Protein-coupled Receptor 55*)

Il GPR55 è un recettore a 7 domini transmembrana accoppiato a proteine G (fig. 10). Da molti autori è considerato ancora oggi un recettore orfano, mentre altri lo classificano come recettore CB-like [Ross R.A. *et al.*, 2009]

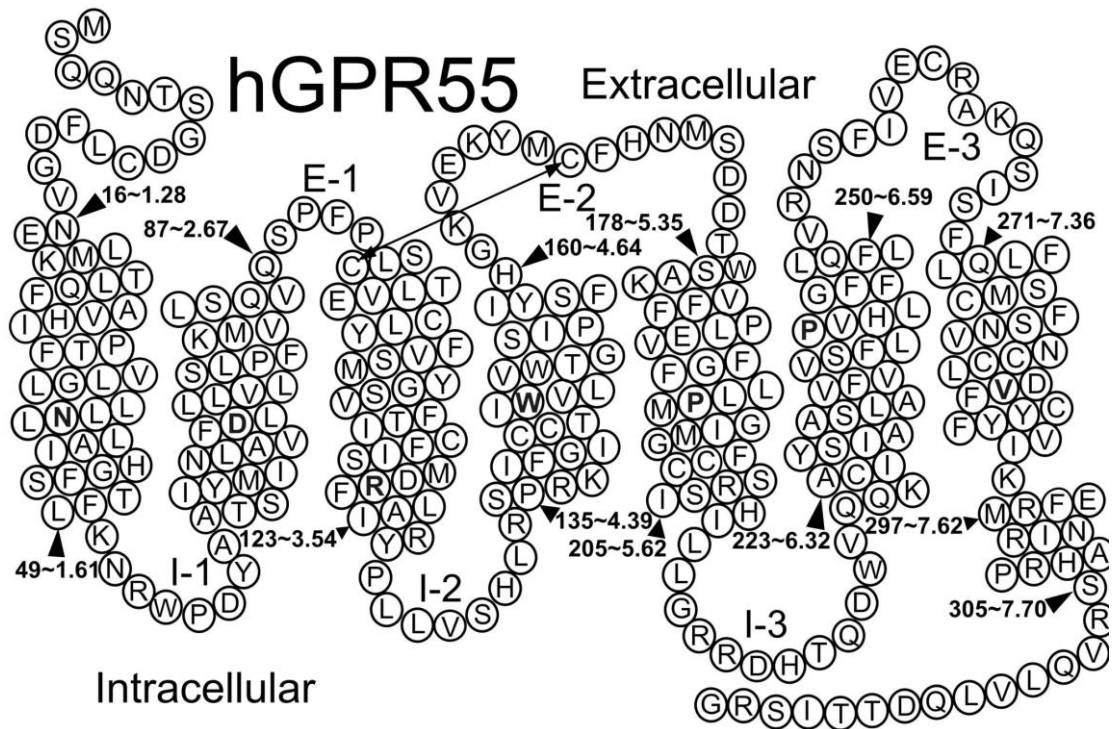


Figura 10. Struttura del GPR55.

Il GPR55 fu proposto per la prima volta come possibile recettore cannabinoidale da GlaxoSmithKline e AstraZeneca [Sharir H. and Abood M.E., 2010] sebbene la sua omologia strutturale con i recettori del sistema endocannabinoidale è risultata molto bassa; le percentuali di identità sono del 13,5% con il CB₁ e del 14,4% con il CB₂ [Andradas C. *et al.*, 2011].

Il recettore si trova espresso nel SNC, a livello del nucleo caudato, putamen, ippocampo, talamo, ipotalamo, cervelletto e corteccia frontale. Il recettore è anche espresso in diversi tratti del sistema gastrointestinale, così come nella milza, tonsille, testicoli, timo, cellule endoteliali e nella muscolatura liscia di alcuni vasi e in cellule della microglia [Ross A. R. 2008].

1.4.1 Ligandi per il GPR55

La farmacologia del GPR55 è ancora oggetto di studio e ci sono opinioni controverse per quanto concerne le molecole che possono fungere da agonisti e antagonisti di questo recettore.

Henstridge C.M. *et al.*, 2009 propongono l' α -Lisofosfatidilinositolo (LPI) come il principale ligando endogeno del GPR55, anche se altre molecole di natura lipidica, quali l'Acido Lisofosfatidico (LPA) e la Sfingosina-1-Fosfato (S1P) sembrano attivare il recettore.

Per contro, uno studio condotto da Oka S. *et al.*, del 2007 propone l'LPI come unico attivatore endogeno del GPR55, escludendo l'attivazione da parte di LPA e S1P. Quest'ultimo studio, molto interessante, prevede l'utilizzo della linea cellulare HEK 293 sia trasfettata con GPR55 che wild-type e per valutare l'attivazione del GPR55 da parte dei lipidi sopra indicati, vengono considerati come indici il grado di fosforilazione di ERK e la mobilitazione di Ca^{++} intracellulare. Lo studio mostra che l'LPI induce fosforilazione di ERK e mobilitazione di Ca^{++} solo nelle cellule trasfettate con GPR55, mentre gli altri lipidi, LPA e S1P, inducono fosforilazione di ERK e mobilitazione di Ca^{++} sia in cellule trasfettate che non. Tali risultati indicano che l'LPA e S1P svolgono la loro azione per interazione con target diversi dal GPR55. Nello stesso lavoro, vengono

testate anche molecole cannabinoidi quali AEA, 2-AG, virodamina, N-PEA, CP55940, Hu-210, win55212, cannabinolo eSR141716A; tali molecole non fosforilano ERK nè in cellule esprimenti GPR55 nè in cellule wild-type, suggerendo che anche i composti cannabinoidi in esame hanno target diversi dal GPR55.

Altri autori, invece, propongono molecole cannabinoidi, naturali e sintetiche, come ligandi (agonisti/antagonisti) del GPR55 [Shair H and Abood M.E., 2010; Ross A. R. 2008]. Shair e Abood in uno studio del 2010 indicano che il GPR55 risponde agli endocannabinoidi AEA, 2-AG, ai fitocannabinoidi cannabidiolo e Δ^9 -THC, in modo diverso a seconda del tipo cellulare e del tessuto in esame, proponendo così l'ipotesi di risposte cellule/tessuto specifiche.

Altri autori, ancora, mettono in evidenza l'importanza della concentrazione per spiegare il comportamento come agonisti/antagonisti di molecole cannabinoidi sul GPR55. In particolare Ross A.R., nel 2008, evidenzia che tali composti sono in grado di attivare il GPR55 a concentrazioni maggiori di 10 μ M attraverso la via delle ERK, e di indurre mobilitazione di Ca⁺⁺ intracellulare solo a concentrazioni maggiori di 30 μ M. Altri autori invece descrivono AEA e 2-AG come potenti agonisti GPR55 con EC₅₀AEA = 18nM e EC₅₀2-AG = 3 nM [Ryberg E.*et al.*, 2007].

Ross A.R., in un lavoro molto recente, del 2011, ipotizza che l'AEA attivi il GPR55, non per via diretta, ma attraverso una regolazione mediata dal recettore CB₁ ed il coinvolgimento di specifiche integrine di membrana.

Altri autori descrivono AEA e 2-AG come agonisti parziali del GPR55 [Henstridge C.M. *et al.*, 2009].

Interessante è anche l'articolo pubblicato da Henstridge C.M. *et al.*, nel 2010. In questo studio viene valutata l'azione agonista/antagonista sul GPR55 di 3 composti di sintesi a struttura diarilpirazolica, descritti come antagonisti CB₁ selettivi, quali AM251, SR141716A e AM281 (fig.11). I risultati ottenuti con questi composti sono paragonati a quelli ottenuti con LPI somministrato esogenamente. Lo studio è realizzato su cellule HEK 293 stabilmente trasfettate con GPR55 attraverso diversi saggi funzionali:

- Rilascio di calcio RhoA dipendente
- Attivazione di NFAT (fattore nucleare delle cellule T attivate)
- Fosforilazione ERK_{1/2}
- Attivazione di CREB (target di ERK/MAPK e del signaling del calcio)
- Attivazione del fattore di trascrizione Nf-Kb

In linea generale i composti attivi sul GPR55 risultano l'AM251 e l'SR141716A. L'AM281, pur essendo un antagonista CB₁ con potenza simile a AM251 e SR141716A, è il composto meno attivo sul GPR55. Sulla base della struttura chimica dei tre composti (fig.11) è ragionevole supporre che le caratteristiche del gruppo carbossamidico in posizione 3 dell'anello diarilpirazolico siano più importanti per il legame al GPR55 che al CB₁.

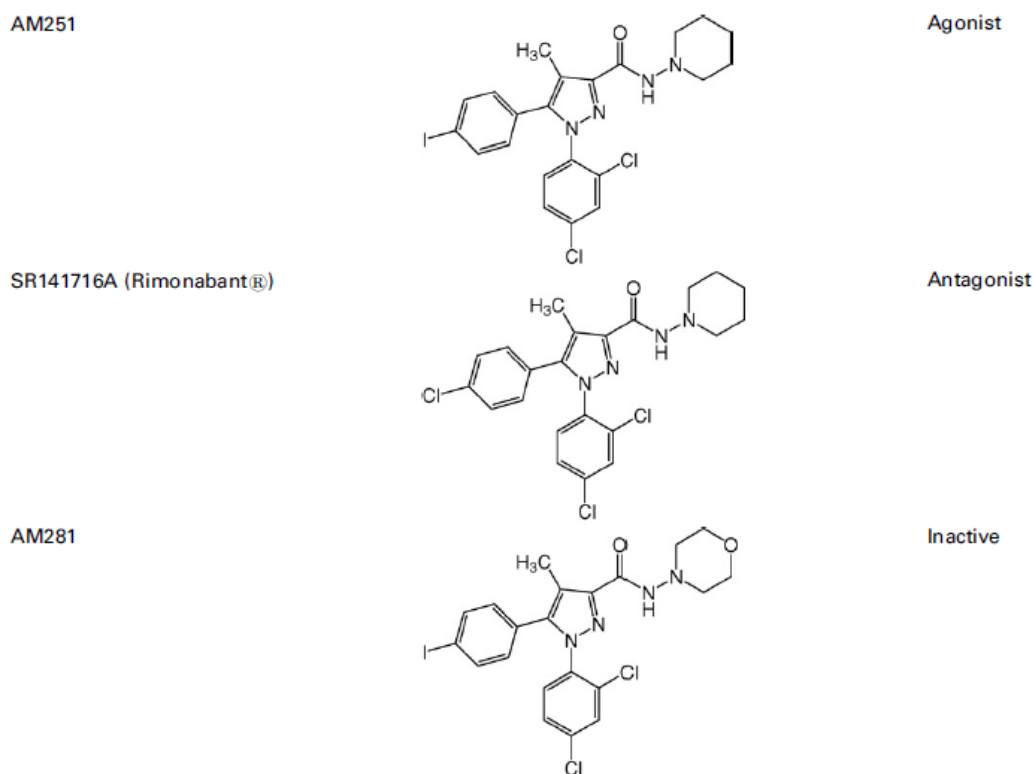


Figura 11. Composti diarilpirazolici.

1.4.2 GPR55 e cancro

Alti livelli di GPR55 sono stati osservati in diversi tipi di tumori. Nel tumore al seno è stata riscontrata una correlazione diretta tra i livelli di espressione del GPR55 e aggressività della malattia [Andradas C. *et al.*, 2010]. Anche altre tipologie tumorali, adenocarcinoma del pancreas e glioblastoma, hanno mostrato elevati livelli di espressione del GPR55 accompagnati a iperproliferazione cellulare e prognosi infausta [Sharir H. and Abood M.E., 2010]. Non sono state riscontrate correlazioni, invece, tra l'espressione del GPR55 e altri marker prognostici per il cancro, quali ad esempio livelli di espressione dei recettori per gli estrogeni, dimensione della massa tumorale, livelli di p53 etc. E' stata, però, osservata una correlazione tra l'aumento dell'espressione del GPR55 e l'aumento della velocità della proliferazione cellulare, come più sopra detto. Parallelamente agli elevati livelli di espressione del GPR55, in

alcune linee cellulari tumorali, si sono evidenziate elevate concentrazioni di LPI, il quale, attivando il recettore GPR55, sembra essere alla base dell'iper-proliferazione e della crescita tumorale [Ross R.A., 2011]. In linea generale, in pazienti con cancro si osserva:

- Aumento di espressione del GPR55
- Aumento dei livelli di LPI, LPA e S1P
- Aumento dell'attività degli enzimi responsabili della biosintesi dei lipidi endogeni attivatori del GPR55
- Downregulation delle fosfatasi che degradano i lipidi endogeni agonisti del GPR55 [Andradas C. *et al.*, 2011].

Solo lo studio condotto da Hung Li *et al.*, del 2011, su una linea di colangiocarcinoma umano, ha indicato un effetto antiproliferativo in seguito ad attivazione del GPR55 da parte di AEA e O1602 (agonista selettivo GPR55).

Tutte queste evidenze fanno del GPR55 un nuovo possibile biomarker e target terapeutico in oncologia [Andradas C. *et al.*, 2011].

1.4.3 Meccanismi di trasduzione del segnale

Dati in letteratura indicano che l'attivazione del recettore GPR55 promuove la proliferazione cellulare, attraverso molteplici vie: accoppiamento con proteine $G_{\alpha 12/13}$ e G_q , le quali innescano, a loro volta, meccanismi di fosforilazione ERK, attivazione della RhoA con rilascio di calcio intracellulare; attivazione di fattori trascrizionali, come il fattore NFAT e l' $\text{NF-}\kappa\text{B}$ [Ross R.A. 2009; Henstridge C.M. *et al.* 2010].

Nello studio di Hung Li *et al.*, del 2011 emerge invece che l'attivazione del GPR55 da parte di ligandi quali O1602, induce morte per apoptosi in

seguito a traslocazione del GPR55, proteina $G_{\alpha_{12/13}}$ e complesso FAS-recettore di morte, dai RAFT non lipidici di membrana ai RAFT lipidici di membrana (zone ricche in colesterolo e sfingolipidi). In figura 12 sono schematizzati i principali pathway di signalling per il GPR55.

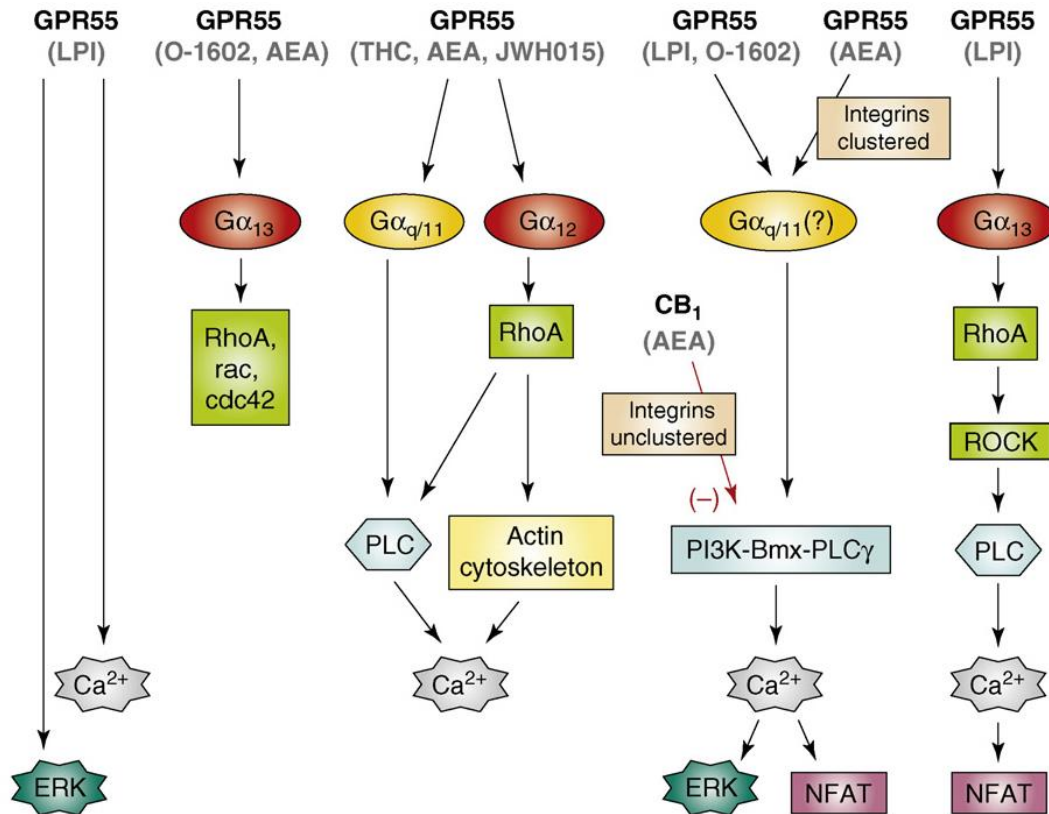


Figura 12. Signalling pathway del GPR55.

Capitolo 2

Scopo della ricerca

La letteratura degli ultimi anni evidenzia come i composti cannabinoidi e endocannabinoidi possano giocare un ruolo fondamentale nella inibizione della proliferazione delle cellule tumorali, nell'angiogenesi e nelle metastasi di molti tipi di tumore [Guindon J. and Hohmann A.G. 2011]. Questo ruolo sembra avvalorato anche dalla evidenza di differenti livelli di endocannabinoidi tra tumore e tessuto sano corrispondente [Flygare J. e Sander B. 2008].

Il melanoma cutaneo é tra le neoplasie più maligne che colpiscono la pelle, caratterizzato da un aumento dell'incidenza negli ultimi decenni, elevata mortalità, alto potere metastatico e una generale refrattarietà ai chemioterapici convenzionali. Poco ancora si conosce del coinvolgimento del sistema endocannabinoide in questo tipo di tumore [Hamtaux et al. 2012].

In studi funzionali, condotti in una precedente tesi, è stata evidenziata un'attività citotossica *in vitro* dell'endocannabinoide AEA su cellule di melanoma cutaneo A375 [Vanni A. Attività antitumorale di composti cannabinoidi su cellule di melanoma cutaneo A375, AA 2010-2011].

Partendo dal dato sopra riportato, nel presente lavoro di tesi sono stati indagati possibili meccanismi cellulari attraverso cui l'endocannabinoide svolge l'azione antitumorale evidenziata. In particolare sono stati studiati i recettori CB₁, GPR55, TRPV1 e il contributo del metabolismo COX-2. La presenza dei target è stata rilevata nella linea cellulare da studi di RT-PCR; mentre studi funzionali sulla vitalità cellulare, attraverso saggio

colorimetrico WST-1, sono stati eseguiti per vedere il peso che ciascun target aveva nell'azione dell'endocannabinoide.

Capitolo 3

Materiali e metodi

3.1 Materiali utilizzati negli studi funzionali

3.1.1 Farmaci e composti commerciali utilizzati

Il composto AM251 è stato ottenuto dalla Tocris Bioscience (Bristol, UK). L'endocannabinoidi anandamide e i composti capsazepina e O-1602 sono stati acquistati dall'Ascent Scientific (Bristol, UK). Capsaicina, β -metilciclodestrina sono stati ottenuti dalla Sigma-Aldrich (Milano). Il farmaco rofecoxib è stato gentilmente donato dal laboratorio del Dottor Calderone.

Le sostanze sono state solubilizzate ciascuna nell'opportuno solvente. O1602, capsaicina, capsazepina, rofecoxib, sono state solubilizzate in DMSO e diluite in mezzo di coltura all'1% di FBS, fino all'ottenimento delle concentrazioni utilizzate nei test di vitalità. La percentuale di DMSO presente nella concentrazione più elevata testata delle sostanze non supera mai lo 0,5%, condizione fondamentale per evitare l'interferenza del solvente nei test di citotossicità nel nostro modello sperimentale; l'AM251 è stato sciolto in etanolo. Tutte le altre sostanze sono state acquistate pre-dissolte in soluzioni di etanolo anidro. Le formule chimiche e i composti utilizzati sono riportati in figura 13.

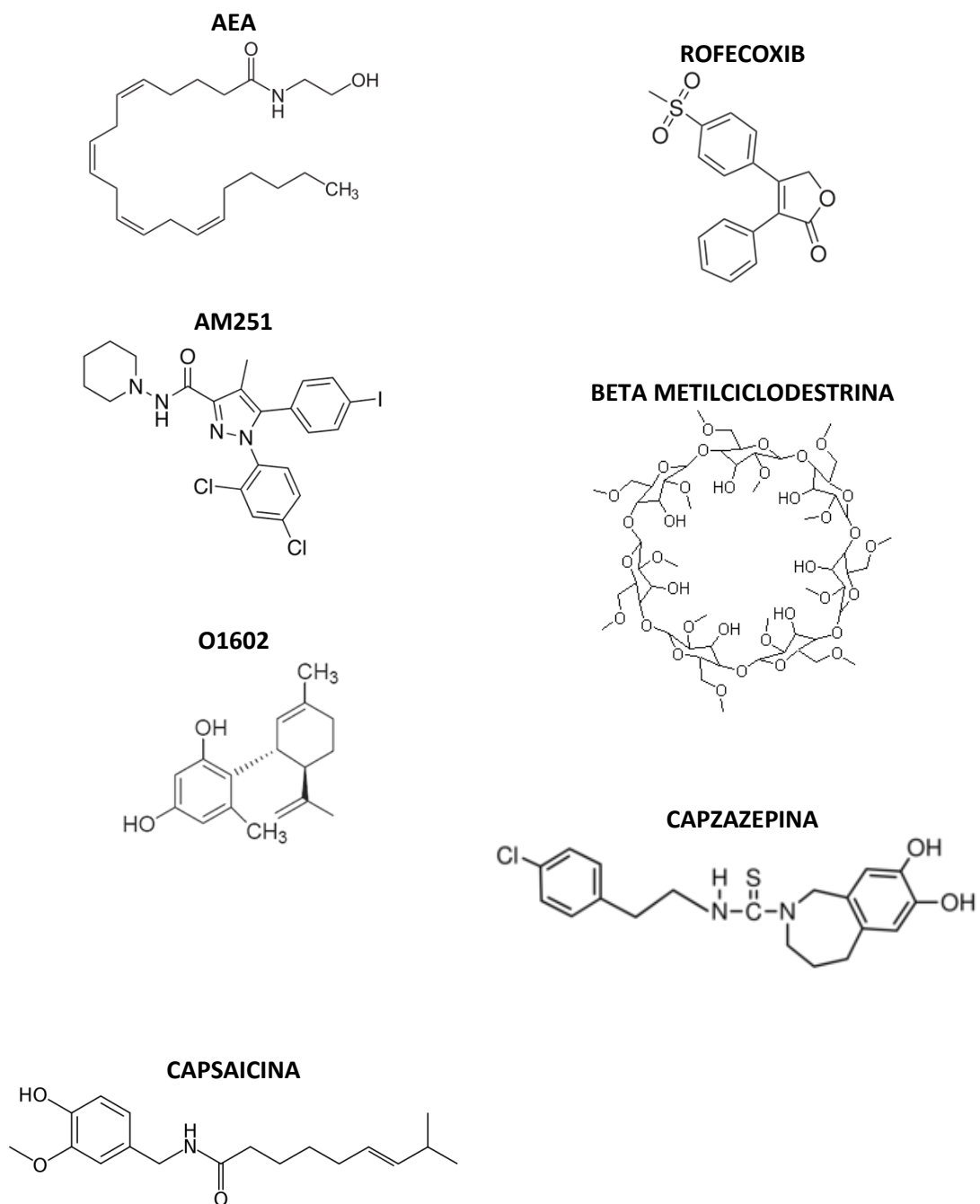


Figura 13. Sostanze in esame

3.1.2 Linee cellulari

Nel modello sperimentale sono state utilizzate cellule di melanoma cutaneo umano A375 (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MA, USA) (fig.14) e, come linea non tumorale, cheratinociti umani HaCaT, (gentilmente donate dal Dott. G. Turchi del CNR di Pisa) che crescono adese alla superficie della fiasca, assumendo un aspetto allungato. Le linee cellulari sono caratterizzate da un tempo di duplicazione di circa 30 ore. Le cellule sono state mantenute in coltura terreno costituito dal mezzo base Dulbecco's Modified Medium (DMEM, Sigma Aldrich, Milano), a cui sono stati aggiunti il 10% di siero fetale bovino (FBS, Sigma Aldrich, Milano) e l'1% della miscela 1:1 degli antibiotici penicillina (50 UI/ml) e streptomicina (50 µg/ml) (EuroClone, Milano).

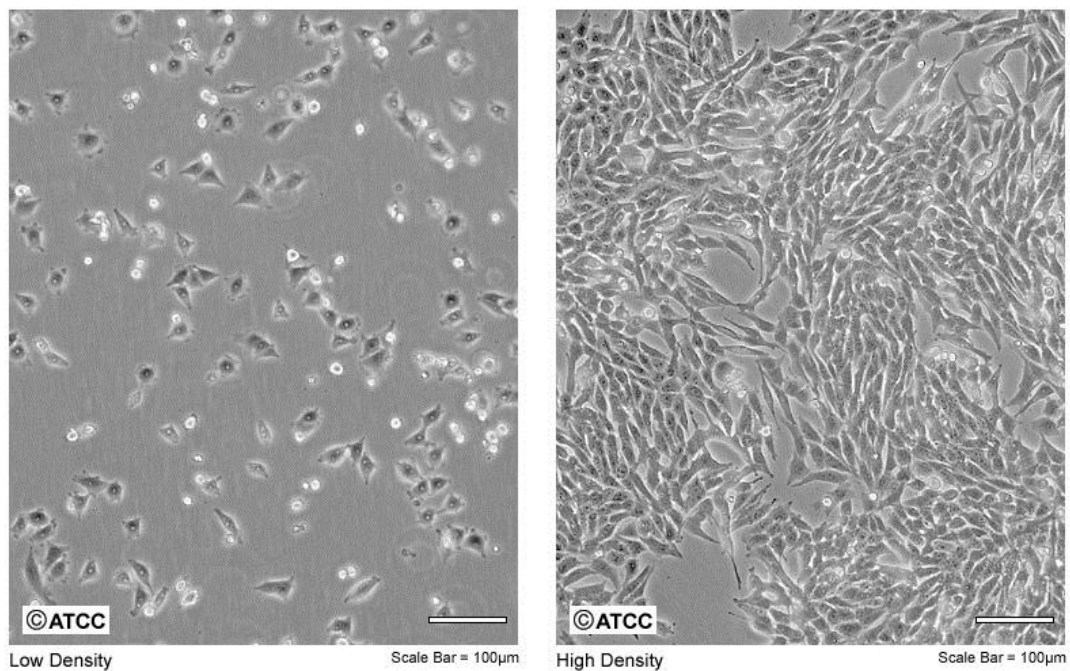


Figura14. Fotomicrografica delle cellule A375 a bassa densità (sinistra) ed alta densità (destra) di crescita.

3.2 Materiali per gli studi di biologia molecolare

3.2.1 Oligo utilizzati

I primer utilizzati per amplificare le sequenze dei geni per i target oggetto del nostro studio sono stati scelti facendo riferimento a sequenze presenti in letteratura o alle sequenze di RNA messaggero umano per le relative proteine.

Le sequenze scelte sono state introdotte in “Primer-Blast” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), un programma disponibile sul sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, che permette di valutare se la coppia di primer è specifica solo per la proteina di interesse o se può portare all’amplificazione di prodotti genici indesiderati e di sequenza già depositata.

Dopo questo primo controllo, le sequenze sono state analizzate tramite il programma “Oligo-Primer Analysis Software” versione 5.0, il quale consente di ricevere informazioni sugli eventuali loop che si possono creare all’interno di un singolo innesco e sulla potenziale formazione di dimeri fra gli inneschi senso e antisenso. Il verificarsi di tali eventi in particolari regioni dei primer potrebbe non consentire un corretto appaiamento con i filamenti di DNA durante la prima fase della reazione di PCR. Tramite “Oligo-Primer” si ricevono anche informazioni utili di carattere termodinamico quali, ad esempio, la temperatura di *melting* di ciascun primer e la densità ottica (OD).

Le sequenze dei primer utilizzati sono riportate nella tabella di seguito. Come controllo positivo di espressione è stata scelta la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), che, essendo una proteina codificata da

un gene housekeeping, è presente in tutti i tessuti. La rilevazione dello specifico prodotto di PCR, attraverso l'osservazione della specifica banda elettroforetica su gel di agarosio, è prova di una corretta esecuzione del protocollo di retrotrascrizione.

Tutti i primer indicati in tabella sono stati forniti dalla ditta Sigma-Genosys (Sigma-Aldrich Milano).

OLIGO		SEQUENZA (5'-3')	LUNGHEZZA
GAPDH	F	GTGAAGGTCGGAGTCAACG	19
	R	GGTGGAGACGGCCAGTGGACTC	22
hCB1	F	CCACTCCCGCAGCCTCCG	18
	R	ATCAGGCAAAACGCCACCAC	20
hCB2	F	GGTGACAGAGATAGCCAATG	20
	R	GCCAATGAACAGGTATGAGG	20
hGPR55	F	ACAGTTTGCAGTCCACATCC	20
	R	ACGCTTCCGTACATGCTGAC	20
hCOX-1	F	GCCTGACTCCTTCAAGATCG	20
	R	AGGGACAGGTCTTGGTGTG	20
hCOX-2	F	TGAAACCCACTCCAAACACA	20
	R	AACTGATGCGTGAAGTGCTG	20
hTRPV1	F	GACTTCAAGGCTGTCTTCATCATCC	25
	R	CAGGGAGAAGCTCAGGGTGCGC	22
hPPAR α	F	CTGGAAGCTTTGGCTTACG	20
	R	GTTGTGTGACATCCCGACAG	20
hPPAR γ	F	TTCAGAAATGCCTTGCACTG	20
	R	CACCTCTTGCTCTGCTCCT	20

I primers per il FAAH sono stati gentilmente donati dal Prof. J. Gertsch University of Bern, Institute of Biochemistry and Molecular Medicine.

hFAAH	F	GAACTGCAGCACGAGATCGA	20
	R	CCCACTGGGCAATCA	18

Tabella 1. Sequenze dei primer utilizzati.

3.2.2 *Kit e reagenti*

Per mantenere la vetreria e gli oggetti utilizzati durante l'estrazione dell'RNA esenti da RNAsi è stata utilizzata la soluzione decontaminante RNaseZAP fornita da Ambion (Austin, USA).

Per la purificazione dell'RNA totale dalle cellule è stato utilizzato l'RNeasy MiniKit (Qiagen, Milano) che comprende: il kit comprende: RNeasy Mini Spin Columns, Collection Tubes da 1,5 e 2 ml, reagenti RNase-Free (beta-mercaptotanololo), acqua RNase-Free e diversi buffer (buffer RLT, buffer RW1, buffer RPE).

La digestione del DNA genomico è stata eseguita con RNase Free DNase Set (Qiagen, Milano) contenente buffer RDD e soluzione DNase I stock.

Per la retrotrascrizione il kit adoperato è stato il QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Milano), composto da gDNA Wipeout Buffer 7x, Quantiscript® Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer 5x, RT Primer Mix, acqua RNase-Free.

Le reazioni di PCR sono state effettuate usando HotStarTaq® PCR (Qiagen, Milano) costituito da: PCR Buffer 10x, HotStarTaq Master Mix, acqua RNase-Free.

I gel per la corsa elettroforetica è stati realizzati utilizzando agarosio all'1% (Sigma-Aldrich, Milano) e tampone TBE 0,5x contenente acido borico 0,9 M, EDTA 0,01 M, Tris 1 M (Sigma-Aldrich, Milano). Il bromuro di etidio (Sigma-Aldrich, Milano) è stato aggiunto alla soluzione per la visualizzazione dei risultati in seguito a esposizione a raggi UV. Ladder 100pb e blu di bromofenolo-xilene sono stati forniti da Bio-Rad (Hercules, USA).

3.3 Metodi utilizzati per studi funzionali

3.3.1 Scongellamento della linea cellulare

Lo scongelamento è la procedura necessaria per riportare le cellule in uno stato metabolico attivo dopo che sono state conservate congelate in azoto liquido per un determinato periodo di tempo.

Il criotubo contenente le cellule viene inizialmente posto in bagno maria a 37°C e agitato con moto rotatorio continuo. Una volta scongelato, il contenuto del vial viene aspirato ed introdotto in una provetta sterile da 15ml. Successivamente si aggiungono goccia a goccia 5-6ml di mezzo di coltura completo, preventivamente riscaldato a 37°C, agitando continuamente la provetta, in modo da equilibrare la sospensione cellulare con il mezzo. Dopo aver aggiunto il quantitativo di mezzo indicato, si risospende delicatamente la soluzione contenente le cellule e si lascia riposare a temperatura ambiente per qualche minuto, prima di centrifugare la provetta a 1100rpm per 5 minuti. A centrifugazione ultimata, il sovranatante viene eliminato, mentre il pellet cellulare viene risospeso in 3-4ml di mezzo completo. La sospensione cellulare viene poi trasferita in una fiasca per coltura contenente 10-12ml di mezzo completo e posta nell'incubatore (37°C, 5% CO₂).

3.3.2 Mantenimento in coltura

La linea cellulare è mantenuta in una fase di crescita esponenziale in fiasche per colture cellulari T75 (Starstedt, Verona, Italia) all'interno dell'incubatore. Le cellule vengono controllate quotidianamente: il mezzo di coltura consumato, arricchito di sostanze di scarto del metabolismo cellulare che causano il viraggio dell'indicatore acido-base dal rosso al giallo, viene regolarmente sostituito con mezzo fresco.

Quando le cellule raggiungono il 75-80% di confluenza, in assenza di inibizione da contatto, un'ulteriore crescita potrebbe comportare la formazione di multistrati cellulari.

Per evitare tale condizione, tutto il mezzo di coltura è aspirato dalla fiasca e viene eseguito un lavaggio con 5-6ml di tampone fosfato (Sigma Aldrich, Milano) per pulire la superficie di crescita da eventuali detriti rimasti. Rimosso il tampone, si aggiunge 1ml di tripsina/EDTA (Sigma Aldrich, Milano) diluito in 1ml di tampone (Sigma Aldrich, Milano) per staccare le cellule dalla superficie di crescita. La fiasca viene portata nell'incubatore per circa 1 minuto, in modo da attivare l'azione della tripsina.

Dopo aver verificato al microscopio che le cellule si sono staccate, si aggiungono 5-6ml di mezzo di coltura per inattivare l'azione proteolitica dell'enzima, quindi la sospensione cellulare viene trasferita in una provetta da 15ml e centrifugata a 1100rpm per 5 minuti a temperatura ambiente. Al termine della centrifugazione, il sovranatante viene eliminato e il pellet cellulare risospeso in mezzo di coltura completo. Le cellule possono essere seminate nuovamente in fiasca per il mantenimento in coltura, oppure congelate.

3.3.3 Congelamento cellulare

Il congelamento cellulare è la procedura necessaria qualora si voglia conservare le cellule per un lungo periodo di tempo in uno stato di quiescenza.

Il mezzo di congelamento utilizzato per le cellule di melanoma cutaneo A375 è costituito da:

- | | |
|--------------------------------|-----|
| – DMEM base non ricostituito | 40% |
| – FBS | 50% |
| – DMSO (Sigma-Aldrich, Milano) | 10% |

Le tre componenti del liquido di congelamento contribuiscono a stabilizzare le cellule per il mantenimento in azoto liquido: il mezzo base è necessario poiché rappresenta un ambiente sierologico ottimale per le cellule da mantenere quiescenti, l’FBS contiene proteine che possono esercitare una funzione stabilizzante e protettiva sulla membrana in seguito ai danni che il congelamento può provocare e il DMSO agisce da criopreservante avendo la funzione di ridurre le dimensioni dei cristalli di ghiaccio che si formano all’interno delle cellule.

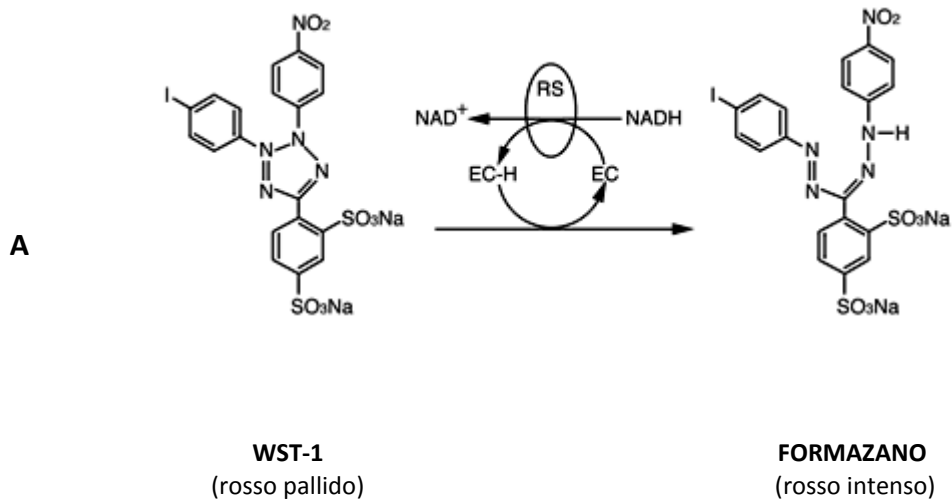
Di norma, vengono preparati 15ml di mezzo di congelamento, da conservare a +4°C, per non più di un mese.

La procedura di congelamento consiste di una prima parte in cui le cellule vengono staccate e centrifugate come nella normale procedura del mantenimento in coltura. Dopo centrifugazione (1100rpm/5minuti), il sovrnatante viene rimosso e il pellet risospeso in 1,8ml di mezzo di congelamento, indipendentemente dalla dimensione del pellet (se è eccessivamente abbondante si possono preparare più criotubi; sarebbe opportuno non congelare più di 5×10^5 cellule per crio-vial). Il criotubo

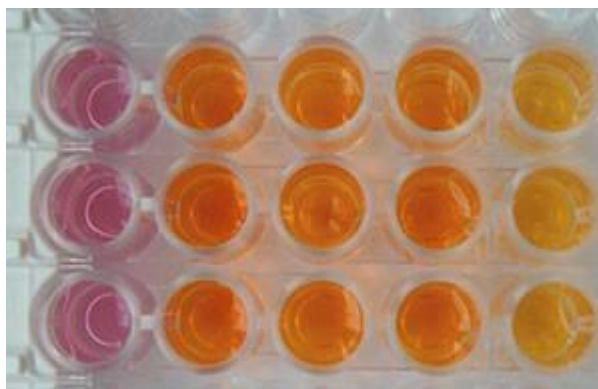
viene infine alloggiato nel contenitore per la conservazione in congelatore a -80°C . Dopo 24 ore di congelamento, il critubo viene posizionato in un rack metallico e inserito nel dewar dell'azoto liquido.

3.3.4 Analisi della vitalità cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio colorimetrico (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche, Mannheim, Germany), dove il reagente principale è un sale di tetrazolio, WST-1, che viene metabolizzato da enzimi mitocondriali in un sale di formazano solubile colorato (fig15).



B



1

2

Figura15. A: Bioconversione del substato WST-1 in sale di formazano solubile. **B:** risultato di un esperimento visualizzato con WST-1. 1) indica i pozzetti che contengono solo cellule e mezzo, 2) indica pozzetti che contengono mezzo, cellule e WST-1: più scuro è il colore, più forte è l'attività metabolica delle cellule.

In particolare, le cellule sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti, considerando un numero di 5000 cellule per ciascun pozzetto. Dopo 24 ore dalla semina, tempo necessario per permettere l'adesione cellulare, il mezzo di coltura è stato rimosso e sostituito con 100 μ l di soluzione contenente i composti e i farmaci da testare, in presenza dell'1% di FBS, in un range di concentrazioni 0,1-100 μ M. Ogni campione è stato analizzato in triplicato, incluso il controllo non trattato. In ciascun esperimento è stato introdotto un campione "controllo" contenente il solvente di solubilizzazione in percentuale corrispondente a quella riscontrata nei pozzetti relativi alla massima concentrazione testata. La soluzione contenente anandamide, è stata sostituita ogni 24, in modo da eludere gli effetti del possibile metabolismo enzimatico FAAH. Negli esperimenti condotti con gli specifici antagonisti per i differenti target oggetto di studio e anandamide, il trattamento con ciascun inibitore è stato condotto due ore prima del trattamento con l'endocannabinoide, in modo da consentire il blocco del target.

Dopo 48 ore di esposizione ai composti, sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 10 μ l di WST-1 per 100 μ l di soluzione. Le piastre trattate con il reagente sono state posizionate in incubatore per circa 1 ora, dopo di che è stata misurata l'assorbanza con il lettore di micro piastre Victor²™ (Wallac, PerkinElmer, Waltham, USA) ad una lunghezza d'onda di 450 nm.

Per ovviare all'assorbimento nel campo del visibile del mezzo di coltura e delle sostanze in esso solubilizzate, fenomeno che può falsare i valori reali di assorbanza, è stato utilizzato un bianco, ovvero un pozzetto contenente la stessa soluzione del trattato, senza cellule seminate al suo interno. Al valore dell'assorbanza di ogni campione è stato sottratto il valore dell'assorbanza del bianco corrispondente.

L'inibizione della vitalità cellulare è stata quindi calcolata come percentuale di assorbanza delle cellule trattate (meno il bianco) verso i controlli non trattati (cellule con solo veicolo), e la concentrazione che determina il 50% di inibizione della crescita cellulare (IC₅₀) è stata determinata sulla curva ottenuta dalla regressione non lineare dei dati (GraphPad Software, San Diego, USA).

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e i valori di IC₅₀, espressi come medie \pm errore standard (SE), sono stati calcolati da tre esperimenti indipendenti (n=3).

3.4 Metodi studi di biologia molecolare

3.4.1 Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale viene estratto in condizioni e con materiali RF (RNase-Free) per limitare la degradazione dell'RNA da parte dell'enzima RNase. Per questo motivo, l'etanolo utilizzato nella procedura viene addizionato di DEPC (dietilpirocarbonato) in rapporto 1:1000 rispetto al volume totale. La soluzione è poi lasciata sotto cappa per una notte, quindi autoclavata per almeno 20 minuti. Le altre soluzioni necessarie all'estrazione sono fornite direttamente RNase-Free.

Il protocollo di estrazione si articola nelle seguenti fasi:

1. Staccare le cellule mediante tripsinizzazione, quindi centrifugare (1100rpm per 5 minuti).
2. Eliminare il sovrnatante e risospendere il pellet ottenuto in mezzo di coltura completo, in volume variabile a seconda delle dimensioni del pellet.
3. Contare le cellule, dopodiché centrifugare (1100rpm per 5 minuti).
4. Eliminare il sovrnatante ed aggiungere 1ml di PBS (Phosphate Buffered Saline), quindi centrifugare (1100rpm per 3 minuti).
5. Eliminare il sovrnatante e risospendere il pellet in 1ml di PBS, quindi centrifugare (1100rpm per 3 minuti).
6. Aspirare il sovrnatante e aggiungere Buffer RLT ricostituito (10µl di beta-mercaptoetanolo per 1ml di Buffer RLT non ricostituito), per lisare le cellule. Il volume di RLT da utilizzare per la lisi dipende dal numero di

cellule del nostro campione, secondo la proporzione fornita dall'RNeasy Mini Kit Handbook (Qiagen, Milano) e riportata sotto.

Numero di cellule (n)	Volume RLT
$n < 5 \times 10^6$	350µl
$5 \times 10^6 < n < 1 \times 10^7$	600µl

7. Agitare la provetta con il buffer, in modo da lisare il pellet. Alla lisi cellulare corrisponde un aumento della viscosità della soluzione: per evitare la formazione di grumi e filamenti, utilizzare una bacchetta in modo da omogeneizzare quanto più possibile il contenuto del lisato.

8. Trasferire il lisato in una eppendorf, quindi aggiungere un volume di etanolo RF 70%, pari a quello di Buffer RLT utilizzato, agitando continuamente per evitare la formazione di due fasi.

9. Caricare una quantità massima di 700µl di lisato cellulare per ogni spin column, quindi inserire la colonna in un collection tube da 2ml e centrifugare per 1 minuto a velocità maggiore di 10 000rpm.

10. Eliminare l'eluato.

11. Procedere con la digestione del DNA genomico attraverso il kit RNase Free DNase Set (Qiagen, Milano):

- Aggiungere 350µl di Buffer RW1, centrifugare per 15 secondi a velocità maggiore di 10 000rpm.
- Aggiungere 10µl di DNase ricostituita (550µl di acqua su DNase liofilizzata, da conservare poi a -20°C) a 70µl di Buffer RDD in una nuova eppendorf, agitare la soluzione, dopodiché prelevare gli 80µl e caricarli sulla spin column.

- Lasciare agire per 15 minuti. Aggiungere 350µl di Buffer RW1 e centrifugare.
- 12. Eliminare l'eluato, aggiungere 500µl di Buffer RPE e centrifugare per 15 secondi a velocità maggiore di 10 000rpm.
- 13. Eliminare l'eluato, caricare altri 500µl di Buffer RPE e centrifugare per 2 minuti a velocità maggiore di 10 000rpm.
- 14. Eliminare il collection tube e procedere con l'ultima centrifugazione utilizzando un tubo nuovo da 2ml.
- 15. Senza aggiungere buffer, centrifugare per 1 minuto a velocità maggiore di 10 000rpm.
- 16. Eliminare il tubo collettore, utilizzare un nuovo tubo da 1,5ml ed aggiungere 40µl di acqua RNase Free sulla membrana, lasciando idratare la membrana per qualche minuto.
- 17. Centrifugare per 1 minuto a velocità maggiore di 10 000rpm.
- 18. L'eluato ottenuto contiene l'RNA, per cui eliminare la colonna e alloggiare il collection tube in ghiaccio.

Per determinare la concentrazione e la purezza dei campioni ottenuti sono state effettuate misurazioni spettrofotometriche nell'ultravioletto, a due lunghezze d'onda: 260nm e 280nm. La stima della purezza del campione è data dal rapporto fra l'assorbanza a 260nm e quella a 280nm. Il valore ottenuto deve essere compreso tra 1,8 e 2: quanto più il valore si avvicina a 2, tanto maggiore è la purezza dell'RNA estratto.

L'integrità dell'acido nucleico viene valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%, effettuata necessariamente con materiali RNase Free, a 120V per 20 minuti.

3.4.2 Retrotrascrizione

La metodica consente di retrotrascrivere l'RNA in cDNA, utilizzato come stampo per la successiva reazione di amplificazione. La retrotrascrizione viene effettuata seguendo la procedura descritta dal QuantiTect® Reverse Transcription Handbook (Qiagen, Milano), riportata di seguito:

1. Scongellare l'RNA e i componenti del kit (gDNA Wipeout Buffer, QuantiScript Reverse Transcriptase, QuantiScript RT Buffer, RT Primer Mix, RNase Free Water) in ghiaccio. Centrifugare brevemente e posizionare in ghiaccio.
2. Preparare la reazione di eliminazione del DNA genomico: 2µl di gDNA Wipeout Buffer 7x, 1µg di RNA totale, RNase Free Water q.b. 14µl. Centrifugare e posizionare in ghiaccio.
3. Incubare per 2 minuti a 42°C nel termocicizzatore e posizionare immediatamente in ghiaccio.
4. Preparare la Reverse Transcription Master Mix: 1µl di QuantiScript Reverse Transcriptase, 4µl di QuantiScript RT Buffer 5x, 1µl di RT Primer Mix.

5. Aggiungere l'RNA totale privo di DNA genomico (14 µl), ottenuto al punto 3, alla Reverse Transcription Master Mix, per un volume totale di 20µl. Centrifugare e posizionare in ghiaccio.

6. Incubare nel termocicizzatore con il protocollo specifico per la retrotrascrizione, che prevede: 30 minuti a 42°C, 3 minuti a 95°C per inattivare l'enzima QuantiScript Reverse Transcriptase.

Il cDNA ottenuto è stato poi utilizzato per le reazioni di PCR o conservato in congelatore a -20°C.

3.4.3 RT-PCR (Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction)

La procedura di PCR è stata eseguita utilizzando HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Milano), il cui protocollo di esecuzione è riportato sotto:

1. Scongellare le soluzioni dei primer (25µM), quindi centrifugare prima dell'uso.
2. Centrifugare la HotStarTaq Master Mix e prelevarne 6,25µl da trasferire in una eppendorf da PCR.
3. Aggiungere 0,2µl di primer Forward e di primer Reverse.
4. Alla mix ottenuta aggiungere 3,85µl di acqua contenuta nel kit, quindi centrifugare brevemente.
5. Aggiungere 2µl di cDNA ottenuti tramite retrotrascrizione, quindi centrifugare brevemente e trasferire il campione nel termocicizzatore, impostando l'opportuno protocollo.

La mix di reazione misura un volume finale di 12,5µl per campione.

I protocolli di PCR eseguiti dal termocicizzatore si compongono delle seguenti fasi:

- 95°C per 15 minuti: attivazione della HotStarTaq DNA Polymerase mediante calore;
- 3 step ripetuti per un numero di cicli variabile a seconda del gene valutato e del grado di espressione dello stesso:
 - 95°C per 1 minuto: fase di denaturazione;
 - *T annealing* per 1 minuto (le temperature di annealing per ogni coppia di primer sono indicate in Tabella 2). Per alcuni primer è stato utilizzato un gradiente di temperatura, non essendo conosciuta la T di annealing ottimale. Il range di temperature applicato è stato scelto in base al valore teorico di temperature di annealing per i due primer, quindi le temperature sono state definite arbitrariamente dal termocicizzatore, dove è possibile impostare solo gli estremi dell'intervallo desiderato, se si lavora in gradiente;
 - 72°C per 1 minuto: fase di estensione;
- 72°C per 10 minuti: fase di estensione finale.

I campioni ottenuti possono essere utilizzati immediatamente per la corsa elettroforetica o conservati a -20°C.

OLIGO		SEQUENZA (5'-3')	TEMPERATURA annealing (°C)	CICLI DI PCR	LUNGHEZZA AMPLIFICATO (bp)
GAPDH	F	GTGAAGGTCGGAGTCAACG	55	30	300
	R	GGTGGAGACGGCCAGTGGACTC			
hCB1	F	CCACTCCCGCAGCCTCCG	58 (ipotetica) ΔT usato: 56-60	35	293
	R	ATCAGGCAAAACGCCACCAC			

			banda migliore: 59,7		
hCB2	F	GGTGACAGAGATAGCCAATG	55 (ipotetica)	35	208
	R	GCCAATGAACAGGTATGAGG	ΔT usato: 52-56		
hGPR55	F	ACAGTTTGCACTCCACATCC	55 (ipotetica)	35	261
	R	ACGCTTCCGTACATGCTGAC	ΔT usato: 53-57 banda migliore: 55°C		
hCOX-1	F	GCCTGACTCCTTCAAGATCG	55	36	446
	R	AGGGACAGGTCTTGCTGTTG			
hCOX-2	F	TGAAACCCACTCCAAACACA	55	36	385
	R	AACTGATGCGTGAAGTGCTG			
hTRPV1	F	GACTTCAAGGCTGTCTCATCATCC	69	35	372
	R	CAGGGAGAAGCTCAGGGTGCGC	ΔT usato: 66-72 banda migliore: 69,7		
hPPARα	F	CTGGAAGCTTTGGCTTTACG	56	36	371
	R	GTTGTGTGACATCCCGACAG			
hPPARγ	F	TTCAGAAATGCCTTGCACTG	56	36	332
	R	CACCTCTTTGCTCTGCTCCT			
FAAH	F	GAACTGCAGCACGAGATCGA	ΔT usato: 54,8- 65,6	35	55
	R	CCCACTGGGCAATCA	banda migliore a: 65.6		

Tabella 2. Protocolli di PCR utilizzati e lunghezza degli amplificati attesi.

3.4.4 Elettroforesi su gel di agarosio

L'integrità dell'RNA totale estratto e il risultato delle amplificazioni sono stati valutati mediante corsa elettroforetica sottomarina su gel di agarosio all'1%. Il gel è stato preparato con tampone TBE 0,5x, ottenuto per diluizione della soluzione madre TBE 10x la quale contiene: acido borico 0,9M, EDTA 0,01M e Tris 1M a pH 8,4. Gli esperimenti sono stati effettuati in apparati orizzontali, con voltaggio costante di 90-100V, usando TBE 0,5x come tampone di corsa.

Nelle corse elettroforetiche per la valutazione dell'integrità dell'RNA totale sono stati caricati 6μl di soluzione contenente: campione, acqua RF, 1μl di blu di bromofenolo-xilene. Tutto il materiale utilizzato deve essere RF per evitare la degradazione dell'RNA: l'apparato per elettroforesi viene perciò trattato con RNase Zap prima di effettuare la

corsa, mentre il tampone TBE 0,5x è stato preparato (con la stessa procedura descritta per l'etanolo) RNase Free il giorno prima di effettuare la corsa.

Nelle corse dei prodotti di PCR sono stati caricati 6µl di Ladder 100pb, per la visualizzazione della lunghezza dell'amplificato di PCR, e 6µl di soluzione contenente 1µl di blu di bromofenolo-xilene e 5µl di campione.

La presenza dell'acido nucleico, in entrambi i casi, è stata messa in evidenza su gel di agarosio tramite colorazione con bromuro di etidio e visualizzazione sotto luce UV.

Capitolo 4

Risultati e discussione

4.1 Valutazione dell'attività citotossica dell'AEA

L'endocannabinoide AEA è stato testato in un range di concentrazione 0,1-100 μ M per 48 ore di esposizione sulla linea cellulare di melanoma cutaneo umano A375. La soluzione di AEA è stata sostituita ogni 24h di trattamento. I risultati ottenuti sono indicati in figura 16. La sostituzione del farmaco dopo 24h ha mostrato di migliorare il profilo citotossico dell'endocannabinoide (<IC₅₀), in maniera analoga a quanto rinvenuto con l'inibizione FAAH (dati non riportati).

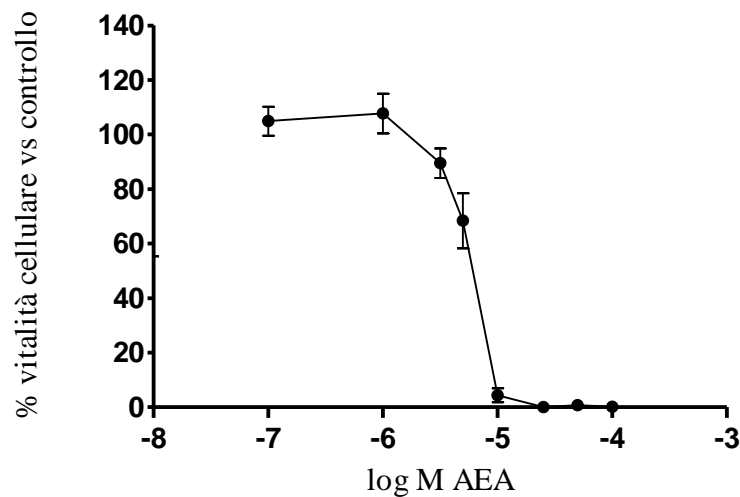


Figura16. Riduzione della vitalità cellulare della linea A375 in seguito a trattamento con AEA (0.1-100 μ M), 48h di esposizione, 1% di FBS

Dal grafico si evince che l'AEA è in grado di ridurre la vitalità cellulare in modo concentrazione-dipendente con un IC₅₀ di $5,82 \pm 0.3 \mu$ M.

Per valutare i possibili meccanismi attraverso cui l'AEA è in grado di ridurre la vitalità/proliferazione delle cellule in studio, sono stati presi in esame diversi possibili target dell'endocannabinoide, in particolare recettori risultati espressi nelle A375 a livello di mRNA. Per comprendere il contributo di ciascun target all'effetto antiproliferativo di AEA, sono state effettuate curve concentrazione-risposta all'endocannabinoide in presenza di specifici antagonisti/inibitori.

In dettaglio, è stato valutato:

4.1.1 Coinvolgimento del recettore CB₁ nell'azione citotossica dell' AEA

Data l'espressione dell'mRNA per il recettore CB₁ sulla linea A375 (fig. 17), è stata testata AEA in presenza dell'antagonista CB₁ selettivo AM251 alla concentrazione 0.5µM risultata non citotossica di per sé ma, come indicato dalla letteratura, in grado di bloccare il recettore (fig.18).

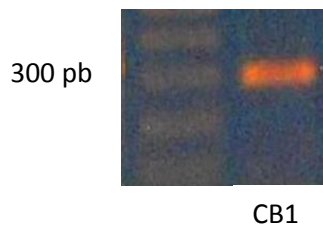


Figura 17. Elettroforesi su gel di agarosio del prodotto di PCR ottenuto con primer relativi al CB₁

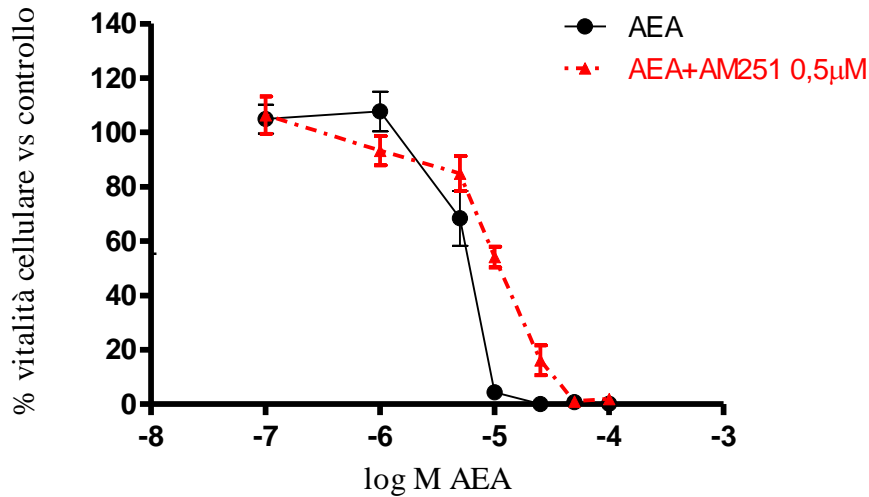


Figura 18. Riduzione della vitalità cellulare della linea A375, dopo trattamento con AEA (0.1-100 μM) in presenza di AM251 0.5 μM, dopo 48h di esposizione, 1% FBS. In nero la curva AEA (0.1-100 μM). In rosso la curva AEA+AM251

In presenza di AM251 (curva rossa) la curva dell'AEA subisce un leggero spostamento verso destra portando l'IC₅₀ a $10,96 \pm 0.58 \mu\text{M}$. Questo dato suggerisce che l'azione dell'AEA è dovuta, almeno in parte, all'interazione con il recettore CB₁.

4.1.2 Il contributo del metabolismo COX-2 all'azione citotossica di AEA

Sulla base dei risultati degli studi di biologia molecolare che evidenziano l'espressione dell'mRNA per la COX-2 sulla linea A375 (fig. 19) e di dati in letteratura che indicano un effetto citotossico di prostaglandine etanolamidi (PG-EA), prodotti del metabolismo dell'AEA via COX-2 [Van Dross Rukiyah T. 2009], è stato valutato l'effetto di AEA in presenza di rofecoxib, inibitore COX-2 selettivo, testato alla concentrazione non citotossica 1 μM (fig.20).

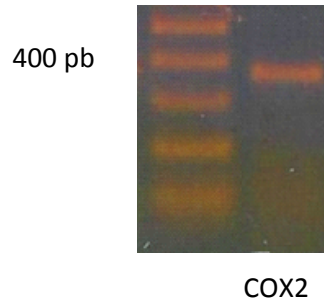


Figura 19. Elettroforesi su gel di agarosio del prodotto di PCR ottenuto con primer relativi alla COX-2

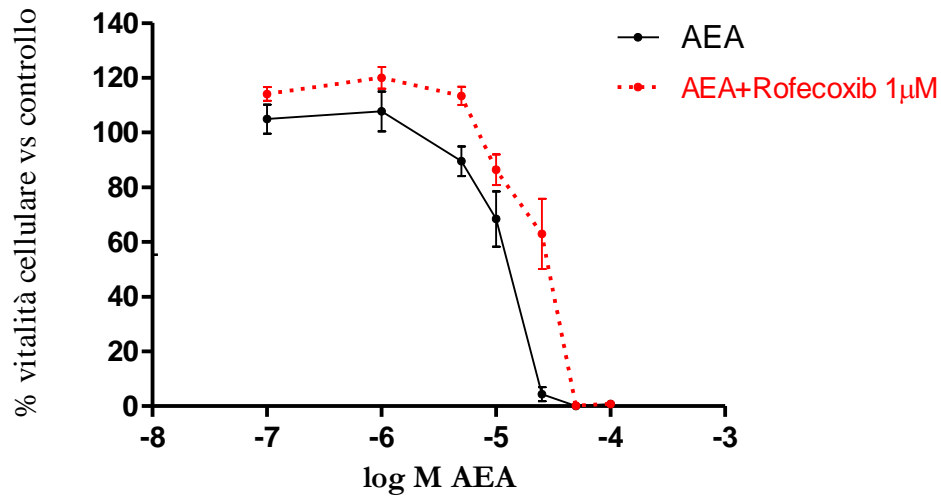


Figura 20. Riduzione della vitalità cellulare della linea A375, dopo trattamento con AEA (0.1-100 μ M) in presenza di rofecoxib 1 μ M, dopo 48h di esposizione, 1% FBS. In nero curva dell'AEA (0.1-100 μ M). In rosso curva AEA+Rofecoxib

In presenza di rofecoxib, la curva dell'AEA è spostata significativamente verso destra e l'IC₅₀ è uguale a 27,11 \pm 2.01 μ M. Questo dato suggerisce che l'effetto citotossico di AEA è dovuto, almeno in parte, ai prodotti del metabolismo COX-2.

4.1.3 Coinvolgimento del recettore GRP55 nell'azione citotossica di AEA

Dati in letteratura relativi all'effetto di AEA *via* GPR55 sono controversi. L'AEA viene considerata dalla maggior parte degli autori un agonista del

GPR55, tuttavia, mentre alcuni descrivono un'azione pro-proliferativa dell'endocannabinoide via GPR55, uno studio recente condotto da Hung Li e colleghi nel 2011 su una linea di colangiocarcinoma umano, indica un effetto antiproliferativo in seguito ad attivazione del GPR55.

Dopo aver valutato l'espressione del target tramite RT-PCR (fig.21), abbiamo verificato l'ipotesi indicata da Huang Li di un effetto anti-proliferativo di AEA (vedere sezione *Introduzione* della presente tesi); a questo scopo sono stati testati rispettivamente: O1602 (agonista selettivo GPR55, a concentrazione pari all'IC₅₀), β -metilciclodestrina (distruttore del RAFT lipidico di membrana, a concentrazione non citotossica 100 μ M), AEA (a concentrazione pari all'IC₅₀) e le associazioni di ciascun agonista con β -metilciclodestrina (fig.22).

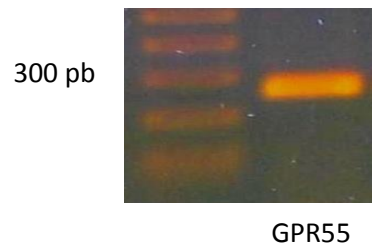


Figura 21. Elettroforesi su gel di agarosio per il prodotto di PCR ottenuto con primer relativi al GPR55

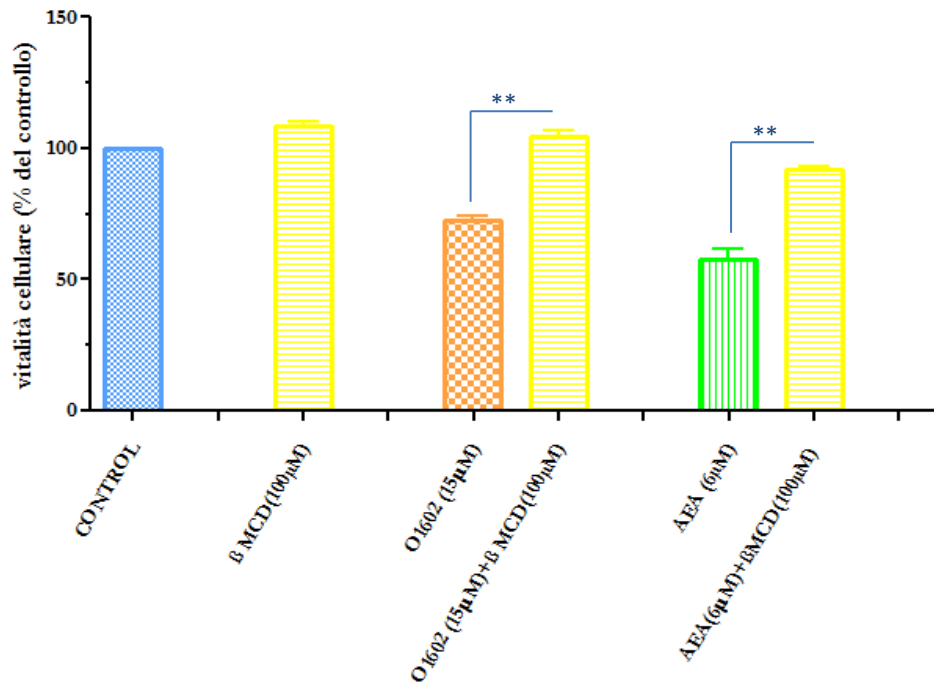


Figura 22. Vitalità cellulare di cellule A375 pretrattate con il distruttore del RAFT lipidico β -metilciclodestrina 100 μ M 2h prima dell'aggiunta di O-1602 (15 μ M) o AEA (6 μ M). I dati sono ottenuti dopo trattamento per 48h in mezzo all'1% di FBS, $p \leq 0.05$

I risultati mostrano che le associazioni O1602+ β -metilciclodestrina e AEA+ β -metilciclodestrina reversiono l'effetto citotossico degli agonisti. Questo dato è in accordo con il meccanismo proposto da Hung Li e sembra confermare il coinvolgimento del GPR55 nell'azione citotossica di AEA.

4.1.4 Coinvolgimento del recettore TRPV1 nell'azione citotossica di AEA

E' stato anche valutato il coinvolgimento del recettore TRPV1 per cercare di spiegare l'effetto antiproliferativo di AEA. Il profilo di espressione del target sulla linea A375 è indicato in figura 23.

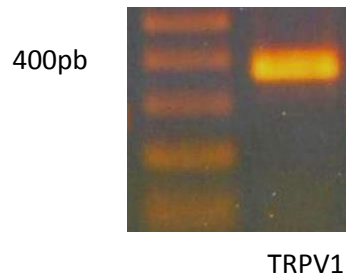


Figura 23. Elettroforesi su gel di agarosio per il prodotto di PCR ottenuto con primer relativi al GPR55

I risultati ottenuti sono alquanto inattesi, infatti, contrariamente a quanto indicato da altri autori (vedere sezione *Introduzione* della presente tesi), è stato osservato un profilo di citotossicità dell'antagonista selettivo capsazepina, che ha mostrato un IC₅₀ a 48h di esposizione pari a 3.6μM (fig.24).

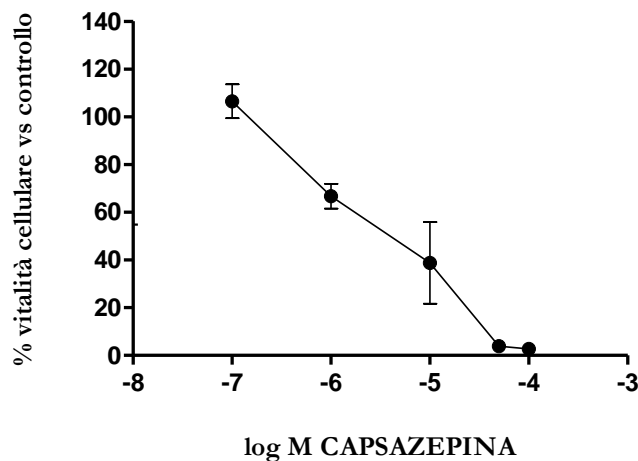


Figura 24. Riduzione della vitalità cellulare della linea A375 in seguito a trattamento con capsazepina (0.1-100μM), 48h di esposizione, 1% di FBS

Questo dato, sembra suggerire un mancato coinvolgimento del recettore vanilloide di tipo 1 nell'effetto citotossico di AEA, descritto come

agonista vanilloide. A conferma di questa ipotesi, il dato ottenuto con l'agonista selettivo per il TPRV1, capsaicina testata nel range di concentrazione 0.1-100 μ M, mostra scarsa citotossicità non raggiungendo il 50% di inibizione (fig.25)

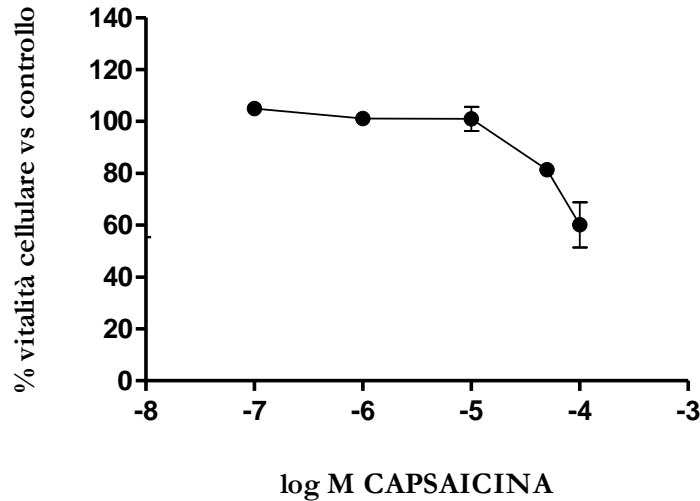


Figura 25. Riduzione della vitalità cellulare della linea A375 in seguito a trattamento con capsaicina (0.1-100 μ M), 48h di esposizione, 1% di FBS

4.2 Profili di espressione ottenuti con RT-PCR su cellule di cheratinociti umani HaCaT

Tutti i possibili target per le molecole cannabinoidi indicati nella sezione *Materiali e Metodi* (tab.2) della presente tesi, sono stati anche valutati sulla linea cellulare non tumorale umana HaCaT, dopo opportuna verifica della qualità e quantità dell'RNA totale estratto e della corretta esecuzione del protocollo di retrotrascrizione.

I risultati ottenuti sono indicati in tabella 3 e indicano un differente profilo di espressione dei diversi target in studio tra la linea di melanoma cutaneo e il controllo sano, cellule cutanee non tumorali.

CB1 (293bp)	CB2 (208bp)	GPR55 (261bp)	TRPV1 (372bp)	PPARγ (332bp)	PPARα (371bp)	COX-1 (446bp)	COX-2 (385pb)	FAAH (55pb)
-	-	-	+	+	+	-	+	-

Tabella 3. Profilo di espressione qualitativa di target valutati tramite RT-PCR. Simboli: + : espresso - : non espresso

Sebbene non sia stato ancora valutato l'effetto dell'AEA su queste cellule, come si può vedere, manca in esse l'espressione di due proteine che svolgono, invece, un ruolo sull'azione antitumorale dell'AEA nelle cellule A375, ovvero i recettori CB₁ e GPR55.

Capitolo 5

Conclusioni

Nel nostro modello sperimentale, l'azione dell'AEA risulta mediata, in parte, dal diretto coinvolgimento del recettore CB₁, come dimostrato dallo spostamento ottenuto dall'antagonista selettivo AM251. I nostri dati, inoltre, hanno evidenziato un coinvolgimento dei *rafts* lipidici di membrana nell'azione dell'endocannabinoide, essendo, l'integrità di tali microdomini, necessaria per la sua azione citotossica. Questo legame è presumibilmente dovuto all'interazione dell'AEA con il recettore GPR55, come suggerito dall'analogia di comportamento dell'endocannabinoide con l'agonista selettivo GPR55 O-1602

Attualmente non sono disponibili antagonisti selettivi del recettore GPR-55; una conferma all'ipotesi del coinvolgimento di questo recettore sarà in futuro ricercata tramite il silenziamento genico dello stesso. L'azione di AEA sembra, inoltre, poter essere ascrivibile in parte significativa ai prodotti del suo metabolismo via COX-2, le prostaglandine etanolamidi. Questo dato, in accordo con evidenze della letteratura [Van Dross RT 2009], è suggerito dal risultato ottenuto con l'inibitore selettivo COX-2, rofecoxib, in grado di spostare la curva all'AEA in maniera significativa.

Non si è evidenziato nei nostri esperimenti, invece, un coinvolgimento del recettore TRPV1 nell'azione citotossica di AEA, contrariamente a quanto descritto in letteratura da studi in altri tipi di tumore.

In conclusione, l'effetto antitumorale di AEA ha mostrato di essere complesso, realizzandosi attraverso più meccanismi. Le evidenze ottenute suggeriscono che la modulazione farmacologica della

concentrazione tissutale dell'endocannabinoide, per esempio tramite inibizione dell'enzima FAAH, potrebbe essere una valida strategia terapeutica nei confronti del melanoma cutaneo e che farmaci in grado di inibire la trasformazione dell'AEA *via* COX-2 potrebbero avere, invece, un impatto negativo su questo tipo di tumore.

Abbreviazioni utilizzate nel testo

AA: acido arachidonico

AEA: anandamide

2-AG: 2-arachidonilglicerolo

CB₁: recettore cannabinoide di tipo 1

CB₂: : recettore cannabinoide di tipo 2

COX-1: prostaglandin-endoperossido sintetasi 1 o ciclossigenasi 1

COX-2: prostaglandin-endoperossido sintetasi 2 o ciclossigenasi 2

DAGL: diacilglicerol lipasi

DMSO: dimetilsolfossido

ECS: sistema endocannabinoide

EDTA: acido etilendiamminotetraacetico

FAAH: fatty acid amide hydrolase

FBS: siero fetale bovino

GAPDH: gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi

GPR55: G protein-coupled receptor 55

LPI: α -lisofosfatidilinositolo

MAGL: monoacilglycerol lipasi

NAPE-PLD: N- arachidonoil fosfatidiletanolamina fosfolipasi D

NArPE o NAPE: N-arachidonoil fosfatidiletanolamina

OA: acido oleico

OAE: virodamina

PA: acido palmitico

PEA: palmitoil etanolamide

PG: prostaglandine

PLA₂: fosfolipasi A₂

PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor

RF: RNase Free

RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction

TRPV1: transient receptor potential cation channel (subfamily V member 1)

Bibliografía

Andradas C., Caffarel M.M., Pérez-Gómez E., Salazar M., Lorente M., Velasco G., Guzmán M., Sánchez C. (2011) The orphan G protein-coupled receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation via ERK. *Oncogene* , 30(2), 245-52.

Alexander A.,Smith P.F.,Rosengren R.J. (2009) Cannabinoids in the treatment of cancer. *Cancer Letters* 285,6-12.

Barish GD, Narkar VA, Evans RM (2006) PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest.*, 116(3):590-7

Brown I., Cascio C.M., Whale W.J., Smoum R., Mechoulam R., Ross R., Pertwee R.G., Heys S.D.,(2010) Cannabinid receptor-dependent and- independent anti-proliferative effects of omega 3 ethanolamides in androgen receptors-positive and - negative prostate cancer cells line. *Carcinogenesis*, 31(9), 1584-159.

De Fonesca F.R., Del Arco I., Bermudez-Silvia F.J., Bilbao A., Cippitelli A., Navarro M., (2005) The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol &Alcoholism* ,40(2),2-14.

Di Marzo V. (2009) The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacol. Res.* , 60(2), 77-84.

Flygare J., Sander B., (2008) The endocannabinoid system in cancer-Potential therapeutic target? *Seminars in cancer biology*, 18, 176-189.

Grimaldi C. and Capasso A. (2011) The endocannabinoid system in the cancer therapy: an overview. *Curr. Med. Chem.*, 18(11), 1575-1583.

Guindon J., Hohmann G., (2011) The endocannabinoid system and cancer: therapeutic implication. *British journ. of pharma.*, 163, 1447-1463.

Hamtiaux L., Masquelier J., Muccioli G G.,Bouzin C., Feron O., Gallez B. and LambertM D.(2012) The association of N-palmitoylethanolamine with the FAAH inhibitor URB597 impairs melanoma growth through a supra-additive action. *BMC Cancer* 12:92.

Henstridge C.M., Balenga N.A.B., Ford L.A., Ross A.R., Waldhoer M., Irving A.J., (2009) The GPR55 ligand L- α -lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NAFT activation. *The FASEB J.*, 23, 183-193.

Henstridge C.M., Balenga N.A., Schröder R., Kargl J.K., Platzer W., Martini L., Arthur S., Penman J., Whistler J.L., Kostenis E., Waldhoer M., Irving A.J. (2010)

- GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways. *Br. J. Pharmacol.* , 160(3), 604-614.
- Hermanson D.J., Marnett L.J.(2011) Cannabinoids, endocannabinoids, and cancer. *Cancer letters Rev*, 30, 599-612.
- Howlett A.C., Barth F., Bonner T. I., Caabral G., Casellas P., Devene W.A., Felder C.C., Herkenham M., Mackie K., Martin B.B., Mechoulam R., Pertwee R.G. (2002) Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.*,54, 161-202.
- Huang L., Ramirez J.C., Frampton G.A., Golden L.E., Quinn M.A., Pae H.Y., Horvat D., Liang L.J., DeMorrow S. (2011) Anandamide exerts its antiproliferative actions on cholangiocarcinoma by activation of the GPR55 receptor. *Lab. Invest.* , 91(7), 1007-1017.
- Kato S., Aihara E., Nakamura A., Xin H., Matsui H., Kohama K., Takeuchi K., (2003) Expression of vanilloid receptors in rat gastric epithelial cells: role in cellular protection. *Bloch. Pharma.*, 66, 1115-1121.
- Kliwer S.A., Sundseth S.S., Jones S.A., Brown P.J., Wisley G.B., Klobe C.S., (1997) Fatty acids and eicosanoids gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4318-4323.
- Munson AE, Harris LS, Friedman M.A., Dewey W.L., Carcham R.A. (1975) Antineoplastic activity of cannabinoids. *J Natl. Cancer Inst.*, 55, 597-602.
- Oka S., Nakajima K., Yamashita A., Kishimoto S., Sugiura T. (2007) Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 362(4), 928-34.
- O'Sullivan SE, (2007) Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *British journ. of pharma.*,152, 576-582.
- Pertwee R.G. (2010) Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Curr. Med. Chem.* , 17(14), 1360-1381.
- Pisanti S., Bifulco M., (2009) Endocannabinoid system modulation in cancer biology and therapy. *Pharmacological research*, 60, 107-116.
- Rockwell C.E., Kaminski N.E., (2004) A cyclooxygenase metabolite of anandamide causes inhibition of interleukin-2 secretion in murine splenocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 311, 683-690.
- Ross R.A., (2009) The enigmatic pharmacology of GPR55. *Cell Press*, 163, 156-163.
- Ross R.A. (2011) L- α -lysophosphatidylinositol meets GPR55: a deadly relationship. *Trends Pharmacol. Sci.* , 32(5), 265-269.

Ryberg E., Larsson N., Sjögren S., Hjorth S., Hermansson N.O., Leonova J., Elebring T., Nilsson K., Drmota T., Greasley P.J. (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* , 152(7), 1092-1101.

Sharir H. and Abood M.E. (2010) Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor. *Pharmacol Ther.* , 126(3), 301-313.

Tominaga M., Tominaga T., (2005) Structure and function TPRV1. *Eur. J. Physiol.*, 451, 143-150.

Van Sickle M.D., Duncan M., Kingsley P.J., Mouihate A., Urbani P., Mackie K., Stella N., Makriyannis A., Piomelli D., Davison J.S., Marnett L.J., Di Marzo V., Pittman Q.J., Patel K.D., Sharkey K.A. (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* , 310(5746), 329-332.

Van Dross R.T. (2009) Metabolism of anandamide by COX-2 is necessary for endocannabinoid-induced cell death in tumorigenic keratinocytes. *Mol. Carcinog.* , 48(8), 724-732.

Indice figure

- Figura 1.** Strutture dei recettori cannabinoidi umani CB1 e CB2 *pag.6*
- Figura 2.** Strutture degli endocannabinoidi AEA e 2-AG *pag.7*
- Figura 3.** Strutture degli endocannabinoidi: 1-NOLADIN ETERE, 2-VIRODAMINA, 3- N-ARCHIDOIDIL DOPAMINA, 4- OLEAMIDE, 5- N-PALMITOILETANOL AMINA *pag. 8*
- Figura 4.** Biosintesi AEA *Figura pag.9*
- Figura 5.** Biosintesi del 2-AG *pag.10*
- Figura 6.** Metabolismo di AEA e 2-AG *pag 11*
- Figura 7.** Attivazione dei recettori cannabinoidi *pag 14*
- Figura 8.** Struttura recettore TPRV1 *pag. 16*
- Figura 9.** Possibili meccanismi di attivazione dei recettori PPAR da parte dei cannabinoidi e degli endocannabinoidi *pag.19*
- Figura 10.** Struttura del GPR55 *pag.20*
- Figura 11.** Composti diarilpirazolici *pag.24*
- Figura 12.** Signalling pathway del GPR55 *pag.26*
- Figura 13.** Sostanze in esame *pag. 30*
- Figura14.** Fotomicrografica delle cellule A375 *pag.31*
- Figura15.** A: Bioconversione del substrato WST-1 in sale di formazano solubile. B: risultato di un esperimento visualizzato con WST-1. 1) indica i pozzetti che contengono solo cellule e mezzo, 2) indica pozzetti che contengono mezzo, cellule e WST-1: più scuro è il colore, più forte è l'attività metabolica delle cellule *pag.38-39*
- Figura16.** Riduzione della vitalità cellulare della linea A375 in seguito a trattamento con AEA (0.1-100µM), 48h di esposizione, 1% di FBS *pag.49*
- Figura 17.** Elettroforesi su gel di agarosio del prodotto di PCR ottenuto con primer relativi al CB1 *pag. 50*
- Figura 18.** Riduzione della vitalità cellulare della linea A375, dopo trattamento con AEA (0.1-100µM) in presenza di AM251 0,5µM, dopo 48h di esposizione, 1% FBS. In nero la curva AEA (0.1-100µM). In rosso la curva AEA+AM251 *pag.51*
- Figura 19.** Elettroforesi su gel di agarosio del prodotto di PCR ottenuto con primer relativi alla COX-2 *pag. 52*
- Figura 20.** Riduzione della vitalità cellulare della linea A375, dopo trattamento con AEA (0.1-100µM) in presenza di rofecoxib 1µM, dopo 48h di esposizione, 1% FBS. In nero curva dell'AEA (0.1-100µM). In rosso curva AEA+Rofecoxib *pag.52*
- Figura 21.** Elettroforesi su gel di agarosio per il prodotto di PCR ottenuto con primer relativi al GPR55 *pag.53*
- Figura 22.** Vitalità cellulare di cellule A375 pretrattate con il distruttore del RAFT lipidico β-metilciclodestrina 100µM 2h prima dell'aggiunta di O-1602 (15µM) o AEA (6 µM). I dati sono ottenuti dopo trattamento per 48h in mezzo all'1% di FBS, $p \leq 0.05$ *pag.54*

Figura 23. Elettroforesi su gel di agarosio per il prodotto di PCR ottenuto con primer relativi al GPR55 *pag.55*

Figura 24. Riduzione della vitalità cellulare della linea A375 in seguito a trattamento con capsazepina (0.1-100 μ M), 48h di esposizione, 1% di FBS *pag.55*

Figura 25. Riduzione della vitalità cellulare della linea A375 in seguito a trattamento con capsaicina (0.1-100 μ M), 48h di esposizione, 1% di FBS *pag.56*

Un sincero ringraziamento alla Prof.ssa Paola Nieri per la fiducia e la pazienza accordatemi.

Un grazie infinito alla Dott.ssa Barbara Adinolfi perché è stata molto di più di un'insegnante paziente e sempre disponibile, era ed è un'amica, il cui sostegno non mi è mai mancato.

Ai miei genitori per aver lottato con me fino alla fine ed essermi stati sempre vicini, non avrei potuto farcela senza di voi. Vi voglio bene!

A voi bimbe: Alice, Costanza, Federica e Alessandra perché non avete mai mollato e mi avete sempre spinto ad andare avanti e a credere in me... grazie!

“L'amicizia non biasima nel momento della difficoltà, non dice con fredda ragionevolezza: se tu avessi fatto così o così. Apre semplicemente le braccia e dice: non voglio sapere, non giudico, qui c'è un cuore dove puoi riposare.”

(Malvida von Meysenburg)

E infine un pensiero alle persone che oggi non possono essere qui con me..i miei nonni Nilda, Ivo, Elvira e Ilo, vi voglio bene!

E a te Zio Enzo... so che saresti stato in prima fila a gioire per me! Ti voglio bene!